



FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

NUEVOS PAPELES DE CLATrina Y DE LAS  
APOLIPOPROTEÍNAS B Y E EN LA INFECCIÓN  
POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C

VIRGÍNIA GONDAR

MADRID, 2015





DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

NUEVOS PAPELES DE CLATrina Y DE LAS  
APOLIPOPROTEÍNAS B Y E EN LA INFECCIÓN  
POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C

DOCTORANDA: VIRGÍNIA GONDAR

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA

DIRECTOR DE LA TESIS: DOCTOR PEDRO L. MAJANO

UNIDAD DE BIOLOGÍA MOLECULAR

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA

DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LA PRINCESA (IIS-PRINCESA)



El presente trabajo de investigación ha sido realizado en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario de La Princesa (IIS-Princesa) bajo la dirección del Doctor Pedro Lorenzo Majano Rodríguez con objeto de obtener el grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Este trabajo ha sido financiado con proyectos de investigación de la Fundación Mutua Madrileña y del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)/Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS)/Fondos FEDER (PI 10/00101 y PI 13/00159).

Doctor Pedro L. Majano  
Investigador Miguel Servet



## AGRADECIMIENTOS



## **Agradecimientos**

Este trabajo, como todos de esta índole, no es mío, pero de todo un grupo de personas. Sin todas y cada una de ellas esta tesis no hubiera sido posible.

En primer lugar, quería agradecer a mi director, Pedro Majano, por brindarme la oportunidad de hacer el doctorado en su grupo. Por su forma de estar en la ciencia y por su compañerismo. He sido muy afortunada al tenerle como jefe durante estos 4 años. Gracias por haberme introducido en el mundo de la hepatitis C. Ha sido un privilegio poder ser testigo de estos últimos años en la investigación del virus de la hepatitis C, que han sido revolucionarios y que ilustran lo mejor que la ciencia puede hacer, juntando investigación básica y clínica hacia la cura de una enfermedad.

Me gustaría agradecer a Elena Fernández-Ruiz, porque sin la entrevista que me hizo hace 5 años para una plaza de técnico en su laboratorio yo no hubiera oído la frase “Es que tú tienes más perfil de investigación...”. Sin ella no hubiera conocido a Pedro, ni empezado esta aventura.

Gracias a mi compañera Paqui que me ha enseñado todo lo que hay que saber en cultivos celulares. Por su compañía en los congresos de virología. Por sus críticas siempre constructivas. Por su profesionalidad y amistad.

Este proyecto empezó con Iñaki, al cual le agradezco su generosidad por compartirlo conmigo y por guiarme en la dirección correcta. Por haberme enseñado tanto en el laboratorio y por tener una respuesta pronta a todas mis preguntas. Y principalmente por haberme enseñado que hay que ser humilde y exigente con uno mismo.

Gracias a Ricardo Moreno, por sus palabras amables y por hacerme sentir en casa.

Quería agradecer a todos mis compañeros de laboratorio: Irene, Patri, Monica, Ana S., Ana R., Rebeca, Rosa, Paloma y Ángel. Muy especialmente a Susanna Leskela, por su amistad, por su ayuda en las estadísticas, por nuestras conversaciones sobre gatitos, series y películas. Al final, Portugal no es tan diferente de Finlandia. A Ana José, porque en los peores momentos, siempre ha estado allí con una sonrisa y animándome para seguir adelante. Y a Mati, que tan difícil me ha puesto todo al

principio y ahora no puedo vivir sin ella. Gracias por transmitirme tus conocimientos y por haberme ayudado tanto con mis PCRs: eres una experta.

Esta tesis fue sembrada muy anteriormente a mi entrada en La Princesa, cuando la empresa en que trabajaba cerró. A pesar de lo difícil que fueron aquellos momentos jamás olvidaré los consejos y ánimos de Cayetano von Kobbe: “Tu deberías hacer la tesis.” Gracias por todo, Caye. Por ser un buen jefe y amigo.

Esta memoria ha sido revisada por la mejor revisora de ortografía y gramática española que existe: Sara Caballero, te debo una muy gorda. Muchas gracias por dejarme sentar a tu lado en esas clases infernales de Estructura de Genomas. Por tu ayuda y una amistad que estoy segura va a durar muchos años.

Gracias a todos los que a lo largo de estos 4 años me han ayudado de alguna manera, prestando un eppendorf, una botella de PBS, unas células competentes... Especialmente en los Servicios de Farmacología y de Inmunología del Hospital la Princesa dónde hay gente que siempre quiere ayudar.

Finalmente a mi madre, que me apoyó a irme fuera de mi país y siempre me animó a hacer investigación. Por todo lo que ella ha abdicado para que yo tuviera la mejor educación posible. Obrigada Mami.

A Luís, mi mejor amigo y mi amor. Gracias por el cariño y apoyo incondicional. Por acompañarme al laboratorio los fines de semana. Por hacer las figuras maravillosas para esta memoria. Por enseñarme las estrellas y los planetas. Adoro-te Belito.



## RESUMEN



## Resumen

El virus de la hepatitis C (HCV) utiliza proteínas de los hepatocitos para infectarlos, replicarse y, finalmente, diseminar la infección. En el presente trabajo hemos analizado el papel de factores celulares esenciales para la infección del HCV en otras fases del ciclo viral en las que no han sido estudiados previamente.

El HCV accede al interior de los hepatocitos por un proceso de endocitosis dependiente de clatrina. En la primera parte de este trabajo demostramos que tanto clatrina como una de sus moléculas adaptadoras, AP-1, participan también en la secreción de partículas virales. Además, observamos que la secreción de las apolipoproteínas B (apoB) y E (apoE), componentes de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y esenciales para la infectividad de los viriones, no se ve afectada por la interferencia de clatrina y AP-1. Nuestros datos apoyan un modelo en el que las partículas del HCV primero se asocian con apoE en el retículo endoplásmico y son posteriormente secretadas a través de una ruta transendosomal dependiente de clatrina y AP-1. Estos son hallazgos importantes, ya que si bien el modelo actual de secreción viral supone que las rutas secretorias del HCV y de las VLDL están íntimamente relacionadas, nuestro trabajo muestra que existen diferencias. Teniendo en cuenta el potencial terapéutico de la modulación del metabolismo de lípidos en la infección por HCV, nuestros datos podrían ayudar a diseñar nuevas estrategias para bloquear la exocitosis del HCV sin perturbar la homeostasis lipídica, logrando así antivirales más eficientes, selectivos y seguros.

En la segunda parte de este trabajo demostramos que la transmisión célula a célula del HCV depende de apoE, pero no de apoB. Nuestros resultados indican que aunque ambas apolipoproteínas son necesarias para el ensamblaje y morfogénesis de los viriones de HCV infectivos por la vía extracelular, apoB no es necesaria para el ensamblaje de viriones que se transmiten célula a célula. Estos datos sugieren la existencia, al menos *in vitro*, de diferentes partículas infectivas del HCV, con un contenido distinto en apolipoproteínas, que se diseminan por rutas distintas. Estos datos permiten atribuir un nuevo papel diferencial a las apolipoproteínas en la patogenia del HCV, ya que la transmisión viral célula a célula es un mecanismo de evasión del sistema inmune, abriendo nuevas puertas de intervención terapéutica.



## ABSTRACT



## Abstract

Hepatitis C virus (HCV) hijacks cellular proteins to infect hepatocytes, replicate, and finally, spread the infection. In this work we studied the role of cellular factors, known to be essential for HCV infection, in other stages of the viral cycle in which they have not been previously studied.

HCV is internalized onto hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. In the first part of this work we demonstrate that clathrin and one of its adaptor molecules, AP-1, are also involved in the secretion of HCV viral particles. Also, the secretion of apolipoproteins B (apoB) and E (apoE), both components of the very low-density lipoproteins (VLDL) and known to be essential for virion infectivity, was not affected by clathrin or AP-1 interference. Our data support a model where HCV particles are firstly associated with apoE at the endoplasmic reticulum and then secreted through a clathrin and AP-1 dependent transendosomal route. These are important findings since the current HCV secretion model implies that the secretory routes of HCV and VLDL are closely related, but our results shows some differences. Given the therapeutic potential of lipid metabolism modulation in HCV infection, our data could help design new strategies to block HCV exocytosis without disrupting lipid homeostasis, paving the way for the development of more efficient, selective and safe antivirals.

In the second part of this work we show that HCV cell-to-cell transmission depends on apoE, but not on apoB. Our results indicate that both apolipoproteins are associated with the assembly and morphogenesis of HCV virions infective by cell-free infection. However, apoB is not necessary for the assembly of infectious virions by cell-to-cell transmission. These data suggest the existence, at least *in vitro*, of different infectious HCV particles with distinct apolipoprotein content, which are spread by different routes. These results might attribute a new differential role to apolipoproteins in the HCV pathogenesis, since viral cell-to-cell transmission is an evasion mechanism from the immune system, opening new doors for therapeutic intervention.





## ÍNDICE



# Índice

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>25</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>31</b>
<b><i>La hepatitis C .....</i></b>	<b>33</b>
Historia.....	33
Epidemiología y patología .....	33
Terapia.....	35
<b><i>El virus de la hepatitis C .....</i></b>	<b>37</b>
Genoma y Estructura.....	37
Ciclo viral .....	39
Entrada .....	40
Replicación y Traducción.....	43
Ensamblaje .....	44
Maduración y Secreción .....	47
Transmisión viral célula a célula.....	48
<b><i>Modelos celulares in vitro .....</i></b>	<b>49</b>
HCVpp .....	50
Replicones.....	50
HCVcc.....	50
Líneas celulares permisivas .....	51
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>53</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>57</b>
<b><i>Líneas celulares.....</i></b>	<b>59</b>
Huh7 .....	59
Huh7.5 .....	59
Huh7-Lunet-N .....	59
Huh7-Con1 .....	59
Huh7.5-GFP-MAVS .....	60
Huh7.5-shApoE .....	60
293T.....	60
<b><i>Cultivos polarizados de Huh7 .....</i></b>	<b>60</b>
<b><i>Plásmidos y vectores retrovirales .....</i></b>	<b>61</b>
Plásmidos para la producción de partículas retrovirales pseudotipadas.....	61
Plásmido para la producción de HCV en cultivo celular .....	61

Plásmidos para la expresión ectópica de apoE.....	61
<b>Anticuerpos primarios y secundarios .....</b>	<b>62</b>
<b>Western blot.....</b>	<b>63</b>
<b>Inmunofluorescencia .....</b>	<b>63</b>
<b>Producción de HCV en cultivo celular.....</b>	<b>64</b>
Digestión y preparación del plásmido pJFH-1 .....	64
Retrotranscripción y purificación.....	64
Electroporación .....	64
<b>Generación de partículas retrovirales pseudotipadas.....</b>	<b>65</b>
<b>Silenciamiento de proteínas usando siRNA .....</b>	<b>66</b>
<b>Expresión ectópica de apoE en células Huh7.5-shApoE .....</b>	<b>66</b>
<b>Ensayos de luciferasa para el estudio de la entrada viral.....</b>	<b>66</b>
<b>Estudio de la replicación viral.....</b>	<b>67</b>
<b>Estudio de la salida viral.....</b>	<b>67</b>
Experimentos con silenciamientos .....	67
Experimentos de inhibición farmacológica .....	68
<b>Inmunoprecipitación .....</b>	<b>68</b>
<b>Determinación de la infectividad viral .....</b>	<b>68</b>
Por PCR cuantitativa .....	69
Por inmunocitoquímica .....	69
<b>Análisis de la expresión de RNA viral por PCR cuantitativa.....</b>	<b>69</b>
Extracción de RNA .....	69
Retrotranscripción.....	70
PCR cuantitativa .....	70
<b>Ensayos de proliferación celular .....</b>	<b>72</b>
<b>Titulación de anticuerpos .....</b>	<b>72</b>
<b>Ensayos de transmisión viral célula a célula.....</b>	<b>72</b>
<b>Ensayos de cocultivo celular .....</b>	<b>73</b>
<b>Determinación de la secreción de apolipoproteínas por ELISA .....</b>	<b>73</b>
<b>Análisis estadístico .....</b>	<b>73</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>75</b>
<b>Caracterización del papel de clatrina en fases tardías del ciclo del HCV.....</b>	<b>77</b>
Clatrina y su proteína adaptadora AP-1 median la salida de HCVcc .....	77
La secreción de HCVcc es dependiente de clatrina y dinamina .....	81
Confirmación del papel de clatrina y dinamina en cultivos polarizados de Huh7 ..	82
El adaptador de clatrina AP-2 no está involucrado en la exocitosis del HCVcc...	83

Clatrina y AP-1 no son necesarias para la secreción de apoB y apoE .....	84
Asociación intracelular de apoE con HCVcc .....	86
Colocalización de la proteína viral <i>core</i> con AP-1 y apoE .....	89
Clatrina y AP-1 están implicadas en la localización de <i>core</i> en endosomas.....	90
<b><i>Caracterización del papel de apoB y apoE en la transmisión célula a célula del HCVcc.....</i></b>	<b>93</b>
Desarrollo de un sistema para estudiar la transmisión célula a célula del HCVcc <i>in vitro</i> .....	93
Papel de apoB y apoE en la transmisión célula a célula del HCV .....	96
El silenciamiento de apoB o apoE no afecta a la entrada ni la replicación del HCV .....	99
El silenciamiento de apoB o apoE no afecta a la expresión ni la localización de los correceptores virales .....	101
ApoB participa en el ensamblaje de viriones infectivos por difusión <i>cell-free</i> ....	102
La expresión de apoE en células productoras es determinante en la transmisión célula a célula del HCV.....	103
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>107</b>
<b><i>Clatrina participa en la salida de partículas infecciosas del HCV .....</i></b>	<b>109</b>
<b><i>Modelo para el estudio de la transmisión célula a célula del HCV.....</i></b>	<b>116</b>
<b><i>ApoB no interviene en la transmisión célula a célula del HCV.....</i></b>	<b>116</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>123</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>127</b>
<b>PUBLICACIONES RELACIONADAS CON ESTA MEMORIA DE TESIS DOCTORAL .....</b>	<b>149</b>



## ABREVIATURAS





## Abreviaturas

**AP-1:** *Adaptor Protein-1*, proteína adaptadora-1

**AP-2:** *Adaptor Protein-2*, proteína adaptadora-2

**AP-3:** *Adaptor Protein-3*, proteína adaptadora-3

**AP-4:** *Adaptor Protein-4*, proteína adaptadora-4

**AP1G1:** subunidad gamma 1 de la proteína adaptadora-1

**AP2M1:** subunidad mu1 de la proteína adaptadora-2

**apoA:** apolipoproteína A

**apoB:** apolipoproteína B

**apoC:** apolipoproteína C

**apoE:** apolipoproteína E

**BFA:** BreFeldina A

**CD81:** *Cluster of Differentiation 81*, cúmulo de diferenciación 81

**CHC:** *Clathrin Heavy Chain*, cadena pesada de clatrina

**cLD:** *cytosolic Lipid Droplets*, gotas lipídicas citosólicas

**COPII:** *COat Protein complex II*, complejo de proteínas de revestimiento II

**DAA:** *Directly Acting Antivirals*, antivirales que actúan directamente sobre el virus

**DGAT1:** DiacilGlicerol AcetilTransferasa-1

**EC:** Ésteres de Colesterol

**EEA1:** *Early Endosome Antigen-1*, antígeno-1 del endosoma temprano

**EGF-R:** *Epidermal Growth Factor Receptor*, receptor del factor de crecimiento epidérmico

**ELISA:** *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

**EphA2:** *Ephrin type-A receptor 2*, receptor de efrina A2

**ESCRT:** *Endosomal-Sorting Complex Required for Transport*, complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte

**FFU:** *Focus Forming Units*, unidades formadoras de foco de infección

**GAG:** GlicosAminoGlicanos

**HBV:** *Hepatitis B Virus*, virus de la hepatitis B

**HCV:** *Hepatitis C Virus*, virus de la hepatitis C

**HCVcc:** partículas de HCV producidas en cultivo celular

**HCVpp:** partículas pseudotipadas con las proteínas de la envuelta del HCV

**HCVs:** partículas de HCV aisladas del suero de pacientes

**HDL:** *High-Density Lipoproteins*, lipoproteínas de alta densidad

- HTA:** *Host-Targeted Agents*, agentes dirigidos contra el huésped
- HTLV-1:** *Human T-lymphotropic Virus-1*, virus linfotrópico humano de células T tipo 1
- HVR1:** *HiperVariable Region 1*, región hipervariable 1
- IF:** InmunoFluorescencia
- IP:** InmunoPrecipitación
- IPS-1:** *Interferon-beta Promoter Stimulator-1*, proteína estimuladora-1 del promotor de interferón beta
- IRES:** *Internal Ribosome Entry Site*, secuencia de entrada ribosomal interna
- JFH-1:** *Japanese Fulminant Hepatitis-1*, hepatitis japonesa fulminante tipo 1
- LAMP-1:** *Lysosomal-Associated Membrane Protein-1*, proteína de membrana-1 asociada a lisosomas
- LD:** *Lipid Droplets*, gotas lipídicas
- LDL-R:** *Low-Density Lipoprotein Receptor*, receptor de lipoproteínas de baja densidad
- LDL:** *Low-Density Lipoprotein*, lipoproteínas de baja densidad
- LVP:** LipoViroPartículas
- MAVS:** *Mitochondrial AntiViral-Signaling protein*, proteína mitocondrial de señalización antiviral
- MHC:** *Major Histocompatibility Complex*, complejo mayor de histocompatibilidad
- MOI:** *Multiplicity Of Infection*, multiplicidad de infección
- MTP:** *Microsomal Transfer Protein*, proteína microsomal de transferencia
- MTT:** *MethylThiazol Tetrazolium assay*, ensayo de metiltiazol tetrazol (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)
- NPC1L1:** *Niemann-Pick C1-Like 1 cholesterol absorption receptor*, receptor de colesterol Niemann-Pick C1-Tipo 1
- PLA2:** *PhosphoLipase A2*, fosfolipasa citosólica A2
- qPCR:** *quantitative Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de polimerasa cuantitativa
- RD114:** retrovirus endógeno felino 114
- RD114pp:** partículas pseudotipadas con las proteínas de la envuelta del virus RD114
- RE:** Retículo Endoplásmico
- RLU:** *Relative Luminescence Units*, unidades relativas de luminescencia
- RVS:** Respuesta Viral Sostenida
- SR-BI:** *Scavenger Receptor type B class I*
- TfR1:** *Transferrin Receptor protein-1*, receptor de transferrina-1
- TG:** TriGlicéridos
- TGN:** *Trans-Golgi Network*, red del trans-Golgi
- TJ:** *Tight Junctions*, uniones intercelulares estrechas

**VAMP-1:** *Vesicle-Associated Membrane Protein-1*, proteína de membrana-1 asociada a vesícula

**VLDL:** *Very Low-Density Lipoproteins*, lipoproteínas de muy baja densidad

**VSV:** *Vesicular Stomatitis Virus*, virus de la estomatitis vesicular

**VSVpp:** partículas pseudotipadas con las proteínas de la envuelta del virus VSV

**WB:** Western blot

**ZO-1:** *Zonula Occludens protein-1*, proteína zona occludens-1

**$\alpha$ 1AT:** alfa-1 AntiTripsina



## INTRODUCCIÓN



## Introducción

### ***La hepatitis C***

#### **Historia**

Hace 40 años, la hepatitis C era una enfermedad desconocida. En 1975 se publicaron los primeros registros de una nueva enfermedad hepática que entonces se llamó hepatitis no-A no-B al detectarse en pacientes hemotransfundidos seronegativos para los virus de la hepatitis A y B (2, 56). El agente infeccioso de esta enfermedad fue aislado por Choo y colaboradores en 1989 y se le denominó virus de la hepatitis C (HCV) (40). En 1991, la agencia estadounidense del medicamento (*Food and Drug Administration*) aprobó el primer tratamiento para la hepatitis C, el interferón alfa (165). A partir de 1992, gracias al desarrollo de un sistema eficiente de detección del HCV que permitió la eliminación de hemoderivados contaminados de los bancos de sangre, fue posible el control de la transmisión por transfusión (165). Estos 25 años de intensa investigación académica y clínica desde el descubrimiento del HCV han permitido el desarrollo de nuevas terapias, aprobadas entre 2014 y 2015 en Estados Unidos (EEUU) y en Europa, logrando tasas de curación superiores al 90% (164). Actualmente más de 40 nuevos fármacos están siendo desarrollados por lo que es probable que en un futuro próximo todos los pacientes infectados por el HCV puedan ser curados (165).

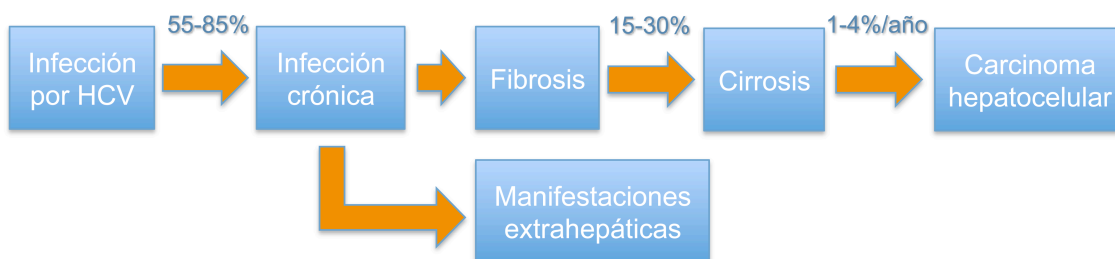
#### **Epidemiología y patología**

La hepatitis C es uno de los mayores problemas de salud a nivel mundial. Se estima que entre 130 a 150 millones de personas, un 3% de la población mundial, están infectadas crónicamente por el HCV, lo que corresponde a cuatro veces el número de personas infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (216). La incidencia real de la hepatitis C es difícil de precisar, ya que la mayoría de los pacientes desconocen que son portadores del virus al no existir síntomas claros y específicos de la enfermedad, que se hace finalmente patente tras décadas de infección (3). Según la Organización Mundial de Salud, anualmente mueren entre 350 y 500 mil personas por complicaciones relacionadas con la hepatitis C (216), siendo además la principal causa de trasplante hepático en Europa y EEUU (179).

El HCV se transmite principalmente por vía sanguínea, asociado al consumo de drogas por vía intravenosa, a transfusiones y al uso de material médico

inadecuadamente esterilizado, estas dos últimas causas sobre todo en países en vías de desarrollo (192, 216). La transmisión vía exposición ocupacional, perinatal o sexual son posibles aunque ocurren en un menor número de casos (3).

El HCV puede infectar a humanos, chimpancés y tupayas (4, 174, 204) cursando en estos últimos como una enfermedad inflamatoria hepática leve (25). El virus persiste en el hígado de los infectados donde infecta casi exclusivamente a los hepatocitos, las células que permiten la replicación viral (167). La fase aguda de la infección por HCV es normalmente subclínica y asintomática (107). El 15-45% de los infectados eliminan el virus espontáneamente mientras que los restantes 55-85% desarrollan una infección crónica persistente (216). La enfermedad crónica no es consecuencia directa de la destrucción de las células hepáticas por el virus sino que resulta de una respuesta inmune insuficiente del huésped, la cual es incapaz de eliminar totalmente el virus pero sí es lo suficientemente prolongada en el tiempo para inducir un proceso inflamatorio crónico en el hígado infectado (52, 179). Los espacios porta hepáticos quedan expandidos por la presencia de un infiltrado inflamatorio, constituido principalmente por linfocitos T. La intensidad de la hepatitis crónica aumenta cuando este infiltrado inflamatorio invade el parénquima hepático circundante (52). El HCV es capaz de seguir replicándose y de persistir en un huésped inmunocompetente, lo cual sugiere que el virus ha desarrollado estrategias para escapar de la respuesta inmune, por lo que la infección evoluciona lenta y progresivamente (52). La fibrosis (acumulación progresiva de fibras de colágeno) y la esteatosis (acumulación lipídica) en el parénquima hepático son las principales consecuencias a largo plazo de la infección (179). En estos pacientes, la infección crónica puede derivar en la aparición de cirrosis, tras aproximadamente 20 años de infección, y de hepatocarcinoma, a partir de 30-40 años tras el primer contacto con el virus (25, 145, 179) (**Figura A**).



**Figura A** – Historia natural de la infección por HCV [Adaptado de *Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis C infection*, WHO, 2014 (215).]



La aparición de manifestaciones extrahepáticas como fatiga, mialgia, problemas cutáneos e ictericia ha sido descrita frecuentemente (25, 179). De igual forma, la presencia de crioglobulinemia y alteraciones autoinmunes y linfoproliferativas ha sido documentada, aunque sus causas no han sido aún claramente identificadas (33). Algunos factores como el género masculino, una mayor edad en el momento de la infección, la obesidad, la coinfección con el HIV (134) o el virus de la hepatitis B (HBV) y el consumo de alcohol son indicadores tanto de una progresión acelerada de la enfermedad como de un aumento de la incidencia de carcinoma hepatocelular (192). El hepatocarcinoma o cáncer de hígado tiene mal pronóstico siendo la tercera neoplasia más letal en el mundo (25, 145, 179).

Hasta la fecha se han descrito 7 genotipos y una multitud de subtipos del HCV con una distribución geográfica distinta, siendo el genotipo 1 el prevalente en Europa y EEUU. El genotipo viral ayuda a predecir la agresividad de la enfermedad, por ejemplo, el genotipo 3 está asociado a un riesgo más elevado de esteatosis hepática. Los distintos genotipos también presentan distinta sensibilidad al tratamiento, siendo el genotipo 1 el de peor pronóstico al tratamiento con interferón (190). Aunque todavía no están claramente definidos, tanto los factores asociados con el genotipo viral como con el huésped son determinantes para la resolución o no de la infección, su evolución y la respuesta al tratamiento con antivirales (97).

## Terapia

A día de hoy, no existe vacuna profiláctica ni terapéutica frente al HCV. La terapia estándar de referencia hasta 2010 estaba basada en una combinación de interferón alfa pegilado (inhibidor de la replicación viral e inmunomodulador) y ribavirina (análogo nucleósido sintético, mutágeno) que lograba una respuesta viral sostenida (RVS) en aproximadamente el 50%-80% de los pacientes tratados, dependiendo del genotipo viral (55, 190). La RVS se define como la ausencia de RNA viral en el suero de los pacientes tras 12 o 24 semanas de la finalización de la terapia antiviral (55). Sin embargo, el tratamiento con interferón y ribavirina conlleva algunos efectos secundarios severos por lo que un gran porcentaje de pacientes no finaliza el tratamiento voluntariamente o por recomendación médica (68, 179, 184). Recientemente se han desarrollado nuevos compuestos antivirales dirigidos contra el virus (DAA, del inglés *Directly Acting Antivirals*) y que han demostrado ser eficaces y seguros (164). Los primeros DAA aprobados, boceprevir y telaprevir, son inhibidores de la proteasa viral NS3-4A (ver siguiente apartado) y están siendo usados en

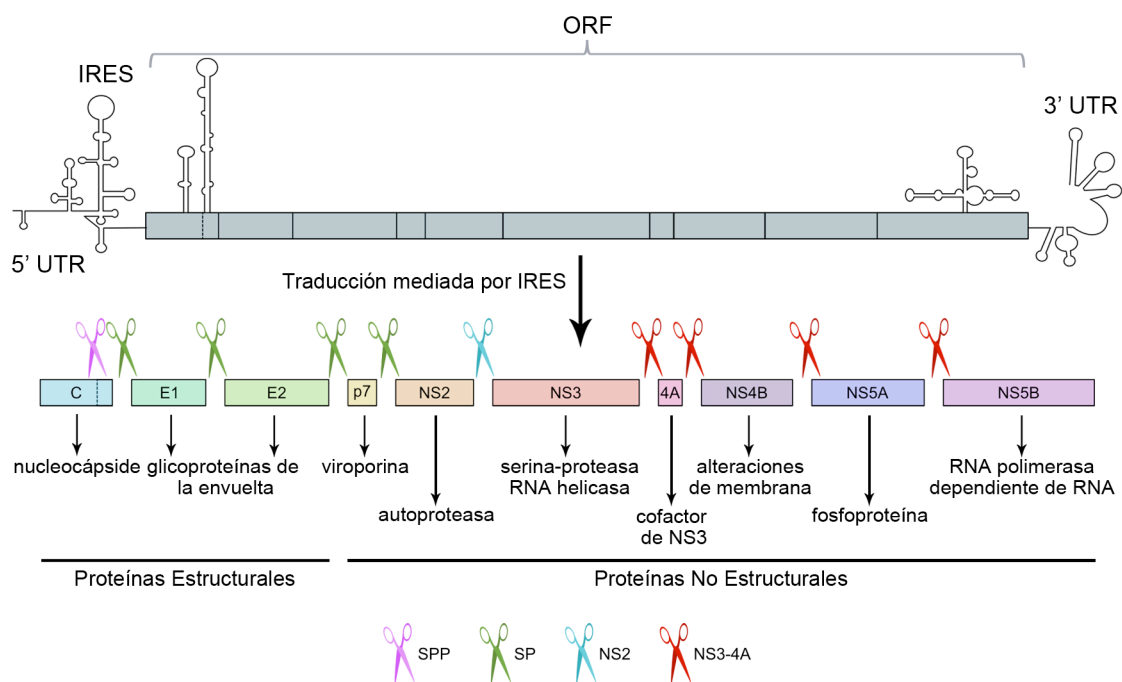
combinación con la terapia estándar con muy buenos resultados en el genotipo 1 (70% de RVS) (177, 190). El fármaco simeprevir, aprobado en España en 2014, es un inhibidor de segunda generación de la proteasa viral NS3-4A, que es mejor tolerado y menos tóxico, y está indicado en el tratamiento de pacientes infectados por los genotipos 1 y 4 del HCV (55). Otro ejemplo son los inhibidores de la fosfoproteína viral NS5A (ver siguiente apartado), daclatasvir y ledipasvir, que fueron aprobados en España a finales de 2014 y tienen acción pangenotípica (213). El inhibidor de la polimerasa viral NS5B (ver siguiente apartado), sofosbuvir, en el cual recaen fundadas esperanzas para la eliminación del HCV a nivel global, fue recientemente aprobado en España y alcanza el 90% de RVS en los genotipos 1, 2, 3 y 4, incluso en grupos con características desfavorables (177, 190). Sin embargo, los DAA normalmente presentan una selectividad específica frente a genotipos concretos, provocan la aparición de mutaciones virales que producen resistencia al tratamiento y presentan efectos adversos adicionales a los del interferón (177, 190). En contraposición, actualmente se están desarrollando agentes dirigidos contra moléculas del huésped (HTA, del inglés *Host-Targeted Agents*) que actúan sobre factores celulares utilizados por el virus en distintas etapas de su ciclo (184). La ciclosporina A y el alisporivir, inhibidores de la ciclofilina A que facilita la replicación del HCV, y el miravirsén, antagonista del microRNA miR122 necesario para la replicación viral, son ejemplos de HTA que han demostrado ser eficaces frente a todos los genotipos y que no se asocian a la aparición de resistencia viral (184). No obstante, los HTA difícilmente desplazarán a los DAA ya que suelen ser menos potentes, requieren periodos de administración prolongados y presentan también efectos adversos.

A la vista de los resultados de los ensayos clínicos más recientes, nuevas terapias con nuevos DAA o distintas combinaciones de DAA y HTA, con o sin interferón o ribavirina, disminuyen la resistencia viral y están revolucionando el tratamiento de la hepatitis crónica por HCV, con resultados muy cercanos al 100% de RVS en todos los genotipos y en pacientes con enfermedad hepática severa y/o trasplantados (165, 184, 213). El ideal terapéutico actual persigue combinaciones de medicamentos administrados por vía oral y que no necesiten ser combinados con interferón (164). Este objetivo es posible a corto-medio plazo ya que muchos otros DAA se incorporarán en los próximos años al tratamiento estándar (213). Esta revolución terapéutica ha hecho pensar que la curación de todos los pacientes crónicamente infectados es factible y la eliminación a nivel mundial del HCV es teóricamente posible en un futuro próximo (163, 164). Sin embargo, los nuevos fármacos son muy caros y de difícil acceso, por lo que hay claras limitaciones económicas para alcanzar este objetivo, acentuadas en los países en desarrollo (165).

## El virus de la hepatitis C

### Genoma y Estructura

El HCV pertenece al género *hepacivirus* de la familia *Flaviviridae*. Es un virus con envuelta lipídica y genoma de 9,6 Kb de RNA de cadena sencilla y con polaridad positiva que codifica para una poliproteína de alrededor de 3000 aminoácidos (147). El marco de lectura (ORF) está flanqueado por regiones no traducidas (UTR) en ambos extremos que les confieren una estructura secundaria compleja esencial para la replicación y traducción viral (113, 199). El extremo 5' UTR contiene una secuencia de entrada ribosomal interna (IRES, del inglés *Internal Ribosome Entry Site*) necesaria para la traducción (62, 98, 124) y un sitio de unión al microRNA miR122 que favorece la replicación (92). El extremo 3' UTR tiene una secuencia poli-U/UC también crucial para la replicación (61, 221). La poliproteína viral es procesada por proteasas virales y celulares formando un total de 10 proteínas virales maduras: las estructurales *core*, E1 y E2 y las no estructurales p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B (113) (Figura B).



**Figura B – Estructura y organización del genoma del HCV.** El RNA del HCV tiene un marco de lectura (ORF) (gris) flanqueado por las regiones 5' y 3' UTR. Su traducción dependiente del IRES, origina una poliproteína que es procesada co y postraduccionalmente dando origen a 10 proteínas virales. La maduración de *core* es posible gracias a las señales de reconocimiento de peptidasas celulares como la peptidasa del péptido señal (SPP) (tijera roja) y la peptidasa señal del retículo endoplásmico (SP) (tijeras verdes) que por su turno también procesa E1, E2 y p7. NS2 es la responsable de su autoprocesamiento (tijera azul). El complejo NS3-4A es el responsable de la liberación de las restantes proteínas virales: NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B (tijeras rojas). [Adaptado de Paul *et al.*, 2014 (161).]

**Core** es procesado por proteasas celulares dando origen a una proteína madura que forma homodímeros estabilizados por puentes disulfuro y que constituyen la nucleocápside viral (111). La cápside del HCV tiene una estructura icosaédrica de aproximadamente 20 nm que encapsula el genoma viral (83). *Core* tiene una secuencia altamente conservada entre distintos genotipos del HCV y presenta un marco de lectura alternativo a partir del cual se puede producir la proteína ARFP, de *alternative reading frame protein*, cuya función se desconoce (28, 211).

**E1 y E2** son glicoproteínas que forman heterodímeros que están anclados en la bicapa lipídica que envuelve la nucleocápside, formando la envuelta del virus (111). Están implicadas en varias etapas del ciclo viral: 1) la entrada viral, ya que median en la unión del virus a los receptores celulares; 2) la fusión entre la partícula viral y la membrana del endosoma temprano; y 3) el ensamblaje de viriones (111, 158, 206).

**p7** es una proteína integral de membrana que actúa como canal iónico. Su papel en el ciclo viral no está claramente establecido, aunque varios estudios indican que pertenece a la familia de las vioporinas y tiene un papel en la maduración y salida de la progenie viral (91, 162, 187, 197).

**NS2** es una proteína integral de membrana, no-glicosilada con actividad cisteín-proteasa que promueve la rotura autoproteolítica de NS2/NS3. Es esencial para la formación del complejo de replicación viral y participa en el ensamblaje y producción de nuevos viriones (89, 91, 161, 175).

**NS3** forma un complejo enzimático junto con su cofactor **NS4A**. Este complejo es multifuncional y tiene dos dominios (111). El dominio serín-proteasa es responsable de la rotura entre las uniones NS4A/4B, NS4B/5A y NS5A/5B (146). El dominio RNA helicasa/NTPasa tiene capacidad de unión a RNA y de despliegue de estructuras secundarias de RNA que es esencial para la replicación viral y parece estar también involucrado en la fase inicial del ensamblaje viral (126). Ambos dominios son dianas atractivas para el diseño de DAA, como por ejemplo, el boceprevir y telaprevir (213).

**NS4B** es una proteína de membrana poco caracterizada que induce alteraciones a nivel de las membranas del retículo endoplásmico (RE) para favorecer el anclaje de las proteínas del complejo de replicación viral (111, 199). También se postula como diana para el tratamiento (35).

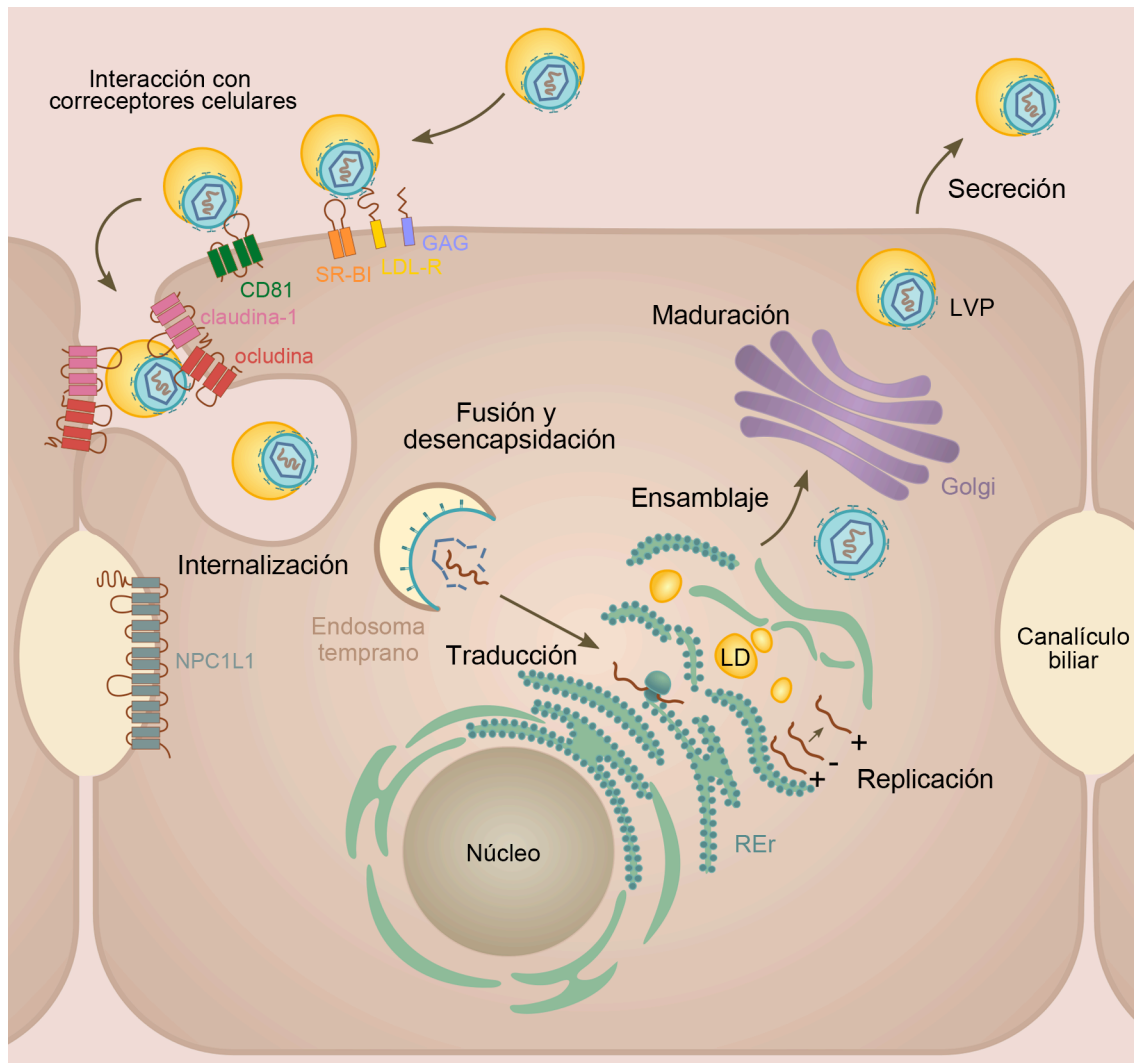
**NS5A** es una fosfoproteína con capacidad de unión a RNA que está involucrada en la replicación viral y en la modulación de la respuesta a interferón y otras vías de señalización en la célula infectada por el HCV (79). Por otro lado, también interactúa con factores celulares importantes para el ensamblaje y producción de virus infectivos (111, 146). Los nuevos DAA aprobados, daclatasvir y ledipasvir, están dirigidos contra esta proteína viral (135).

**NS5B** es la RNA polimerasa dependiente de RNA responsable de la replicación del genoma viral. Esta polimerasa carece de actividad *proof-reading*, por lo que la tasa de mutación del HCV es una de las más altas conocidas para virus de RNA (156, 157, 178). Esta elevada tasa de error es la responsable de la variabilidad genética del HCV, llevando a la existencia de 7 genotipos que difieren entre sí en un 30-35% de la secuencia de nucleótidos (151) y de 67 subtipos que difieren entre sí en un 20-25% (55, 194). Además, debido a la alta tasa de replicación viral un individuo infectado por el HCV presenta un amplio espectro de virus con variantes de secuencia denominadas “cuasiespecies” (128, 190). Esta capacidad para generar variantes permite al virus adaptarse a diferentes condiciones y escapar a la respuesta inmune, lo que favorece su persistencia en el huésped (178). Por estas razones, NS5B es una diana muy atractiva para intervención antiviral. Varios DAA, inhibidores de la actividad de esta polimerasa, se están desarrollando siendo el sofosbuvir el más conocido (195).

La estructura tridimensional de la partícula del HCV no está claramente definida. Se han observado por microscopia electrónica de transmisión partículas víricas más o menos esféricas con un diámetro de 40-80 nm (66, 93, 108, 141, 222). Además, se ha demostrado que el HCV se asocia a lipoproteínas, preferentemente de muy baja densidad (VLDL), formando lipovirionpartículas (LVP) (180, 190). Estas LVP son pleiomórficas, heterogéneas y de densidad baja (114, 161). Tanto las partículas víricas producidas *in vitro* como las aisladas del suero de pacientes tienen una infectividad específica más elevada a densidades más bajas (<1.1 g/mL) en comparación con otros virus de RNA con envuelta, siendo ésta una de las características propias del HCV (114, 161). Esta asociación entre el HCV y las lipoproteínas proporciona al virus protección frente a la neutralización por los anticuerpos del huésped y podría facilitar la entrada viral al interior de los hepatocitos (114).

### Ciclo viral

El HCV circula por la sangre hasta llegar al hígado donde entra en contacto con la superficie basolateral de los hepatocitos (114). Estas células son altamente especializadas y exhiben una polaridad compleja con varios polos basolaterales y apicales (207). Los polos apicales forman el canalículo biliar y los basolaterales están de cara a los sinusoides del hígado donde captan y secretan gran variedad de metabolitos (17). Los hepatocitos son las únicas células capaces de replicar y ensamblar el HCV y de producir lípidos en forma de VLDL (207). El ciclo del HCV en los hepatocitos se resume brevemente en la **Figura C**.



**Figura C – Esquema simplificado del ciclo del HCV.** La entrada del HCV en los hepatocitos requiere su interacción sucesiva con varios correceptores celulares. El virus es internalizado mediante endocitosis dependiente de clatrina y dinamina, alojándose temporalmente en endosomas tempranos. La fusión entre las membranas viral y endosomal provoca la desencapsidación del genoma viral que es liberado al citoplasma. El RNA del HCV es inmediatamente traducido en el retículo endoplásmico rugoso (RER). La presencia de las proteínas virales en el RE provoca alteraciones en las membranas formándose estructuras denominadas *membranous web* donde el RNA viral se replica. Los viriones son ensamblados en el RE en proximidad a los *lipid droplets* (LD). Estas partículas pasan por una etapa de maduración, posiblemente en el Golgi, asociándose progresivamente a lípidos celulares hasta generar lipovirionas (LVP) que son secretadas usando la vía secretoria celular.

### Entrada

La entrada en los hepatocitos del HCV es un proceso complejo, altamente orquestado, que puede dividirse en cuatro fases: 1) unión inicial a la superficie del hepatocito; 2) interacción con correceptores virales; 3) endocitosis mediada por clatrina; y 4) fusión endosomal (48, 225). La unión inicial del virus a la célula diana se establece a través de la interacción secuencial entre la superficie de la partícula viral y

determinadas proteínas de la superficie de los hepatocitos. La apolipoproteína E (apoE) asociada al virus interactúa con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL-R) y los glicosaminoglicanos (GAG) presentes en la superficie del hepatocito (86, 88, 114). Tras la unión inicial, tienen lugar una serie de interacciones secuenciales y coordinadas con al menos cuatro proteínas integrales de membrana que actúan como correceptores: SR-BI, CD81, claudina-1 y ocludina (193).

**SR-BI** (del inglés *Scavenger Receptor type B class 1*) (189, 223) se expresa fundamentalmente en el hígado localizándose sobre todo en la membrana basolateral de los hepatocitos (32, 181). Tiene importantes funciones fisiológicas ya que actúa como receptor de lipoproteínas (HDL, LDL y VLDL) (32, 114, 167). De hecho, SR-BI tiene una alta afinidad por las lipoproteínas asociadas a la partícula viral (51, 114). Su capacidad de transferencia de colesterol hace que estas lipoproteínas se disocien exponiendo la glicoproteína E2 (48, 193). Tras la transferencia lipídica, SR-BI se une a la región HVR1 (*HiperVariable Region 1*) de E2, permitiendo su unión a CD81.

**CD81** fue el primer receptor del HCV identificado por su capacidad de unión a E2 (12, 29, 170). Es una proteína de membrana perteneciente a la familia de las tetraspaninas, de expresión ubicua y con localización mayoritaria en la región basolateral de los hepatocitos (32, 167). La asociación *in vitro* de E2 con CD81 activa varias vías de señalización celular, como las GTPasas H-Ras y Rho, el receptor de efrina A2 (EphA2) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R), induciendo el tráfico lateral del virus a la zona donde se localizan las uniones intercelulares estrechas (TJ, del inglés *Tight Junctions*) (48, 114, 193, 225), formándose el complejo HCV-CD81-claudina-1 (125).

**Claudina-1** está asociada a TJ y se expresa predominantemente en el hígado (32, 54). A pesar de que no hay evidencia de su interacción directa con las glicoproteínas de la envuelta viral, algunos estudios indican que participa en fases tardías de la entrada del HCV, en coordinación con CD81, facilitando su internalización (32, 54, 114, 167). La interacción del virus con claudina-1 promueve la endocitosis del HCV de manera dependiente de clatrina y dinamina (48, 225). La importancia de la localización de claudina-1 en las TJ para la infección por HCV es controvertida, ya que algunos estudios sugieren que no es imprescindible para que ocurra la internalización de los viriones de HCV (72, 117).

**Ocludina** es también una proteína asociada a TJ (63, 166) y es esencial en las fases tardías de la entrada del HCV (117). Aunque el mecanismo concreto sigue siendo desconocido, podría estar implicada en la fusión de las glicoproteínas del HCV en el interior de los endosomas (51, 114). Ocludina se acumula en el RE en células

infectadas por el virus, donde interacciona con E2 (15, 16). Tanto ocludina como CD81 confieren el tropismo específico de especie al HCV (49, 50, 121, 173).

Además de estas moléculas, se han descrito otros factores implicados en la entrada del HCV como el receptor de transferrina-1 (TfR1) (129) y el receptor de colesterol NPC1L1 (del inglés *Niemann-Pick C1-Like 1*) (185). TfR1 es un receptor de hierro, elemento que se acumula en el hígado de pacientes infectados con el HCV (71). Este receptor parece ser importante en un paso posterior a la unión a CD81, aunque el mecanismo específico no se conoce (129). El receptor de colesterol NPC1L1 se localiza en la zona apical y canalicular de los hepatocitos polarizados, donde participa en la absorción e internalización de colesterol de la bilis hacia los compartimentos endosomales del hepatocito (114). El papel específico de NPC1L1 en la entrada viral es desconocido pero todo indica que está relacionado con la incorporación de colesterol, apuntando así a que podría existir un paso de la partícula viral por la bilis antes de acceder definitivamente al interior de los hepatocitos (185).

El HCV es internalizado por endocitosis mediada por clatrina (22, 41, 137). **Clatrina** está constituida por tres cadenas pesadas y tres cadenas ligeras y es el componente estructural de las vesículas que transitan desde la membrana plasmática, la red trans-Golgi (TGN, del inglés *Trans-Golgi Network*) y algunos tipos de endosomas (99, 160). Dependiendo de la molécula a transportar, clatrina interactúa con distintos complejos adaptadores designados AP (del inglés *Adaptor Protein*). Estos complejos son heterotetraméricos y contienen dos subunidades grandes, una mediana y una pequeña (160). Hasta la fecha se han descrito 5 moléculas adaptadoras con funciones distintas, siendo AP-1, -2 y -3 las mejor estudiadas. AP-1 y AP-3 participan en eventos de tráfico intracelular entre el TGN y los endosomas, mientras que AP-2 es el principal complejo adaptador responsable del transporte de moléculas con motivos dileucina o con la señal de reconocimiento basada en tirosinas YXXΦ desde la membrana plasmática (99). Aunque se ha descrito que varios virus usan esta vía para su internalización (139), actualmente se desconocen los adaptadores implicados en la endocitosis del HCV. Por otro lado, está bien establecido que dinamina es la responsable de la escisión de vesículas recubiertas de clatrina que contienen el HCV (115, 117). A pesar de que han sido descritas otras vías alternativas de internalización del HCV *in vitro*, se cree que la endocitosis mediada por clatrina y dinamina sea la principal vía de entrada del HCV (133).

Tras la internalización, el HCV se aloja temporalmente en endosomas tempranos (137). Estas vesículas pueden tener varios destinos posibles: su reciclaje y vuelta a la



superficie celular o su acidificación progresiva y tráfico hacia los lisosomas para la degradación de su contenido (48, 114). La interacción entre el virus, los correceptores, principalmente CD81 (191), y el pH ácido del endosoma causa reordenamientos a nivel de las glicoproteínas que provocan la fusión de las membranas viral y endosomal liberando el RNA viral al citoplasma (114).

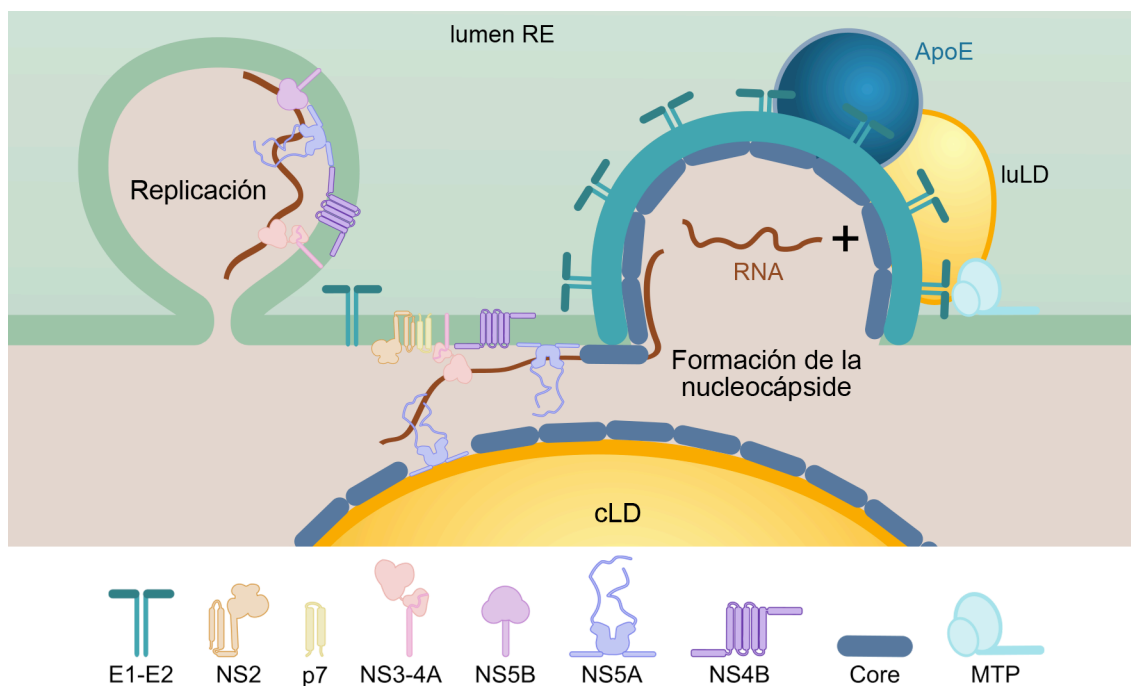
### **Replicación y Traducción**

La replicación del HCV es un proceso muy complejo que requiere la acción coordinada de proteínas virales y celulares. El RNA viral liberado en el citoplasma, al ser de polaridad positiva, puede ser directamente traducido por la maquinaria del huésped dando origen a la poliproteína viral que es procesada por proteasas celulares y virales (48, 51). Las proteínas no estructurales NS3, NS4A/B, NS5A y NS5B forman el complejo de replicación viral (84, 110). Para replicar su genoma, el HCV provoca alteraciones en las membranas del RE formando unas estructuras denominadas *membranous web* que funcionan como factoría de replicación. Esta red de membranas parece ser inducida por la presencia del complejo de replicación y tiene varias funciones: aumentar la concentración local de factores necesarios para una eficiente replicación; coordinar espacialmente el ciclo replicativo; y proteger las proteínas y RNA virales de las defensas antivirales del huésped (161). La fluidez de estas membranas es importante para la replicación y está regulada por la acumulación de colesterol. De hecho, se encuentran asociadas a *lipid droplets* (LD), orgánulos que funcionan como reservas de lípidos, que se han descrito tener un papel central en la coordinación de la síntesis del RNA y la morfogénesis viral (51). La replicación del HCV es dependiente del microRNA miR122 que estabiliza el extremo 5' del RNA viral impidiendo su degradación (51, 193). El miR122, específico del hígado humano, es otro de los factores que puede explicar el tropismo hepático del HCV (60).

La proteína clave en la replicación es NS5B, la polimerasa viral que sintetiza el RNA viral en 2 pasos. Primero, la síntesis de una cadena intermediaria de RNA de polaridad negativa usando como molde el genoma viral de polaridad positiva liberado en el citoplasma. Segundo, la síntesis de RNA de polaridad positiva a partir del intermediario producido anteriormente (51, 113). El mecanismo de regulación de la replicación y traducción viral no es totalmente conocido, pero parece claro que requiere la separación espacio-temporal de la proteína *core* y del complejo de replicación ya que ambos tienen alta afinidad por el RNA viral y entrarían en competición (161). Los genomas recién sintetizados pueden ser traducidos a nuevas proteínas virales, servir de molde para su replicación o ser ensamblados con las proteínas estructurales formando nuevos viriones (51).

## Ensamblaje

Tal como sucede en otros miembros de la familia *Flaviviridae*, el ensamblaje del HCV está altamente coordinado espacial y temporalmente con la replicación viral (111). Además, todas las proteínas virales participan en el ensamblaje del virus, ilustrando así la complejidad de esta etapa del ciclo del HCV (161). La morfogénesis de la partícula viral también requiere la acción coordinada con factores celulares y está estrechamente vinculada al metabolismo lipídico celular (51, 111, 114, 193). Tanto el ensamblaje como la secreción de viriones son procesos muy difíciles de observar en células infectadas, lo que sugiere que son acontecimientos raros y/o muy rápidos (51, 161). A pesar de que no se conoce exactamente cual es su mecanismo, la hipótesis más consensuada postula que el ensamblaje del HCV empieza en la superficie de los LD citosólicos (cLD) a través de un proceso denominado *budding* o gemación (193).



**Figura D – Modelo de ensamblaje del HCV.** El RNA viral producido en las factorías de replicación es transferido a la zona de ensamblaje viral a través de la acción de las proteínas virales NS5A, core y posiblemente NS3-4A. La interacción entre p7, NS2 y NS3-4A permite el reclutamiento de la proteína viral core a las zonas de formación de la nucleocápside. El ensamblaje de las partículas virales es dependiente del reclutamiento de las glicoproteínas E1 y E2 y del *budding* hacia el lumen del RE.

En primer lugar, core es transferido a los cLD, donde se acumula progresivamente (111). Este reclutamiento de core requiere la intervención de proteínas celulares como la fosfolipasa citosólica A2 (PLA2) y la diacilglicerol acetiltransferasa-1 (DGAT1), ambas también necesarias para la formación y la homeostasis de los LD (74, 114,

138). La acumulación de *core* induce un cambio en la distribución de los cLD a la zona perinuclear donde se reclutan las demás proteínas virales necesarias para el ensamblaje (**Figura D**). El dominio de unión a RNA de *core* facilita la incorporación del RNA viral en la nucleocápside, posiblemente con la participación de NS5A, que contiene un dominio de unión al complejo *core*-LD (10). NS5A parece actuar en un paso previo al ensamblaje, quizás bloqueando la replicación, promoviendo el ensamblaje del genoma viral y regulando el tráfico de *core* con la asistencia de p7 y NS2 (5, 131). El complejo NS3-4A es reclutado por NS2 e interviene en los estadios tempranos del ensamblaje reclutando a los cLD que contienen *core* (44). Al tener un dominio de unión a RNA, NS3-4A podría intervenir en el reclutamiento del RNA viral a *core* ayudando así a la formación de la nucleocápside (111). La asociación entre *core* y los LD es muy dinámica ya que la proteína viral necesita ser recuperada de su superficie hacia los sitios de *budding* en el RE. En este sentido, *core* posee un dominio conservado YXXΦ que interactúa con la subunidad mu1 del adaptador 2 de clatrina (AP2M1), el cual ha demostrado ser esencial en su recuperación de los cLD y su posterior ensamblaje (152, 193). Se ha descrito que inhibidores de la activación de AP2M1 bloquean el ensamblaje viral (153).

Por otro lado, las glicoproteínas E1 y E2 quedan retenidas, durante su síntesis, en el RE formando heterodímeros (44). Estos heterodímeros necesitan migrar hasta la proximidad de los cLD para formar la envuelta viral externa. Las proteínas virales p7 y NS2 interactúan entre sí (175) y con los heterodímeros E1E2 facilitando su migración (44, 51, 196). Además, NS5A interactúa con apoE (19) y anexina A2 (7), ambas necesarias para el ensamblaje viral. Las restantes proteínas no estructurales NS4B y NS5B han sido también implicadas, aunque su papel concreto en el ensamblaje del HCV no es conocido (111).

El ensamblaje del HCV presenta varias coincidencias con la generación de VLDL en el hígado humano (51). Las VLDL son reservorios de lípidos que circulan por la sangre transportando triglicéridos (TG) desde el hígado hacia los tejidos periféricos donde son almacenados o consumidos como fuente de energía (111, 199). Las VLDL son ricas en colesterol y ésteres de colesterol (EC) y están recubiertas por una única molécula no intercambiable de apolipoproteína B (apoB), asociándose con otras apolipoproteínas intercambiables como apoE, C1, C2, C3 y A5 (111, 199). La biosíntesis de las VLDL ocurre en dos pasos. Primero, apoB incorpora y encapsula lípidos y se transloca al RE formando una VLDL precursora (10). El correcto plegamiento de apoB requiere que la proteína microsomal de transferencia (MTP, del inglés *Microsomal Transfer Protein*) transporte TG y EC hacia el lumen del RE (114).

Posteriormente, este precursor de VLDL es progresivamente lipidado, formando una VLDL madura que es secretada a través del Golgi usando la vía COPII (del inglés *COated Protein complex II*) (114). Unos modelos sugieren que la lipidación de estos precursores se hace por fusión con LD que contienen apoE y apoC en el RE, mientras que otros defienden que esta lipidación secundaria ocurre en un compartimento post-RE, probablemente el Golgi (111).

Se ha demostrado que inhibidores de la MTP bloquean la generación de VLDL y la producción de partículas virales (65, 78, 87). También se ha estudiado *in vitro* el papel de las diferentes isoformas de apoE en la producción de HCV, siendo las isoformas E3 y E4 las que permiten recuperar la infectividad del virus tras el silenciamiento previo de apoE (75). Las partículas virales producidas en cultivo celular (HCVcc) son eficientemente neutralizadas e inmunoprecipitadas por anticuerpos frente a apoE y apoC1 (143) y su producción se reduce tras el silenciamiento de la expresión de apoE (39, 161). Hueging y colaboradores han señalado que la expresión de apoE en líneas celulares no hepáticas hace que éstas sean capaces de producir partículas infectivas del HCV (80). Este dato sugiere que el tropismo hepático del HCV podría también ser dependiente de la abundancia de apoE en el hígado. Además, apoE interactúa con las glicoproteínas E1 y E2 (27, 87, 106) por lo que es probable que pueda promover la infectividad del HCV al facilitar la entrada viral por su afinidad con algunos correceptores (193). Asimismo, estudios *in vitro* en células polarizadas han demostrado que E1 y E2 son secretadas en asociación con lipoproteínas (82). Todos estos datos hacen pensar que la partícula viral está también constituida por apolipoproteínas. Concretamente, las partículas víricas aisladas del suero de pacientes infectados (HCVs) están asociadas a las apolipoproteínas A-I, B48, B100, C1, C2, C3 y E mientras que las HCVcc están asociadas a las apolipoproteínas A-I, C1 y E pero su asociación con apoB es aún discutida (10, 38, 141). Algunos grupos han documentado la dependencia del ensamblaje de HCV de la expresión de apoB (65, 78, 150) mientras que Jiang y Luo han demostrado que el ensamblaje es sólo dependiente de apoE y no de apoB (87). Igualmente Coller y colaboradores han visualizado el tráfico de partículas víricas en asociación con apoE pero no con apoB (42). Estas discrepancias son sorprendentes ya que apoB es fundamental en la formación de VLDL, lo que parece sugerir que el ensamblaje del HCV depende de los LD del lumen del RE que contengan apoE y no de la completa formación de las VLDL (111). Así, las LVP de HCV pueden resultar de la fusión de la partícula vírica con un precursor de VLDL formado en el RE (10). Actualmente, el mecanismo por el cual las apolipoproteínas son incorporadas a una partícula infectiva madura sigue siendo desconocido.

### **Maduración y Secreción**

Las nuevas partículas del HCV transitan a través de la vía secretoria hacia el Golgi donde maduran adquiriendo lípidos antes de su exocitosis en la superficie celular (66, 114). Las partículas intracelulares de HCVcc tienen una densidad más alta que las partículas extracelulares y adquieren su baja densidad en un compartimento post-RE probablemente en el Golgi (65, 67). El aumento del contenido lipídico de la partícula disminuye su densidad y enmascara epítomos virales que podrían ser reconocidos por el sistema inmune (206). Estos datos indican que las partículas virales ensambladas pasan por un proceso de lipidación similar al de las VLDL (10).

La vía ESCRT (del inglés *Endosomal-Sorting Complex Required for Transport*) ha sido propuesta como necesaria para la secreción del HCV (6). Este sistema es explotado por muchos virus con envuelta para su secreción y está involucrado en la fisión y gemación de vesículas desde el citoplasma y en la formación de cuerpos multivesiculares (111). Varios trabajos han demostrado que la liberación de viriones del HCV *in vitro* es dependiente de la presencia de componentes de esta vía, pero su implicación en el ensamblaje de virus infectivos es controvertida (114, 200). La hipótesis más probable defiende que la maquinaria ESCRT es necesaria en un paso posterior al ensamblaje viral, como el tráfico hacia un compartimento secretorio intermedio, pero que no estaría implicada en el ensamblaje de nuevos viriones. En este sentido, se ha observado *in vitro* el tráfico de partículas de HCV a través de compartimentos endosomales tempranos y tardíos (104). Además, se ha confirmado la colocación de *core* con marcadores endosomales y se ha demostrado su tráfico a través del Golgi antes de ser liberado en la membrana plasmática en un proceso dependiente de VAMP-1 (del inglés *Vesicle-Associated Membrane Protein-1*) (42). Otros estudios, utilizando distintas técnicas de microscopía, han podido demostrar el tráfico intracelular de *core* desde los LD hacia partículas víricas en un proceso dependiente de la interacción con NS2 y NS3-4A y en asociación con apoE, circulando a través de la vía secretoria celular (42, 44). De igual forma, Gastaminza y colaboradores han observado una acumulación intracelular de partículas infecciosas en células tratadas con brefeldina A (BFA), un potente inhibidor del tráfico RE-Golgi (65). Por otro lado, las glicoproteínas E1 y E2 localizadas en la superficie del virus están modificadas postraduccionalmente (5). Estudios *in vitro* han demostrado que están N-glicosiladas y contienen gran cantidad de manosa, aumentando así la resistencia ácida de la partícula, sugiriendo una vez más que las partículas víricas ensambladas transitan por el Golgi (73, 206, 208). Durante su tráfico hacia la membrana plasmática, el HCV es protegido por la viroporina p7, que estabiliza la

partícula protegiéndola del ambiente ácido de los compartimentos por los cuales viaja hacia el exterior celular (10, 114, 219). Conjuntamente estos datos confirman el flujo de viriones infectivos, usando un compartimento endosomal, a través del Golgi en la ruta secretoria celular (111).

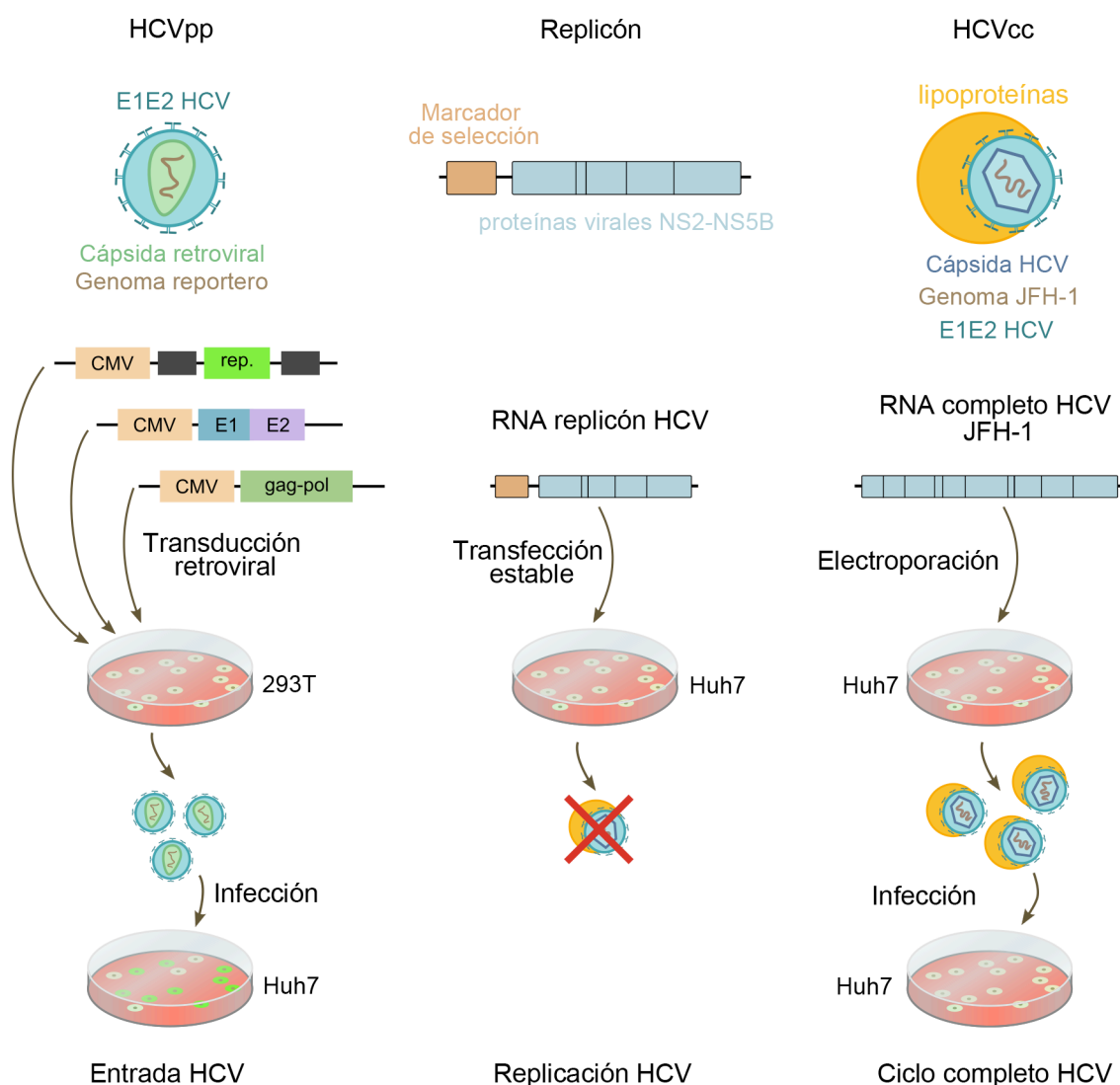
### **Transmisión viral célula a célula**

El HCV infecta los hepatocitos a través de dos vías: utilizando la sangre sinusoidal como medio de difusión, denominada de transmisión extracelular o libre de células (*cell-free*), o por transmisión célula a célula mediante la cual los virus se transmiten directamente de una célula infectada a una célula adyacente no infectada (36, 148, 203, 218). Esta última sólo se ha confirmado *in vitro* (30, 203, 205), pero la presencia de grupos de hepatocitos infectados en el hígado de pacientes infectados por el HCV (109) y el hecho de que los anticuerpos aislados de pacientes sean incapaces de alcanzar el control de la infección *in vivo*, aunque tengan una capacidad de neutralización *in vitro* de casi 100%, hacen pensar que esta vía de diseminación viral puede ser importante *in vivo* (11, 47, 119). De hecho, otros virus como el virus linfotrópico humano de células T tipo 1 (HTLV-1, del inglés *Human T-lymphotropic Virus-1*) (171) o el HIV-1 (130) utilizan este tipo de transmisión como principal modo de difusión. La transmisión célula a célula podría constituir un modo de propagación que permite al virus eludir las respuestas inmunes, ayudando a su perpetuación en el parénquima hepático (36), y ser por tanto determinante en la patogénesis del HCV (188). Incluso podría ser una ruta de diseminación muy importante para ciertas cepas virales resistentes a inhibidores de la entrada del HCV (220).

Varios estudios han confirmado que SR-BI (30, 142), ocludina (30), claudina-1 (30, 203), EGF-R, EphA2 y NPC1L1 (9, 125) son necesarios para la infección célula a célula del HCV *in vitro*. Sin embargo, el papel de CD81 es controvertido (30, 48, 218) y el TfR1 no parece estar implicado (9). Además, trabajos previos han mostrado que la encapsidación del genoma del HCV (30) y la presencia de las glicoproteínas de la envuelta (202) son necesarias para la transmisión célula a célula del HCV. Además, parece ser transversal a todos los genotipos virales (30). Recientemente, dos estudios diferentes han mostrado resultados contradictorios en cuanto al papel de apoE: Hueging y colaboradores mostraron que apoE está implicada en la transmisión célula a célula del HCV en las células no hepáticas 293T (80), mientras que Barretto *et al.* no observaron ningún efecto en este tipo de infección tras interferir apoE, apoB o MTP (9). Finalmente, cabe destacar que los mecanismos de ensamblaje, maduración y secreción de la partícula del HCV transmitida célula a célula no son conocidos.

## Modelos celulares in vitro

El estudio del HCV es posible en gran medida gracias a la disponibilidad de cultivos celulares que permiten reproducir etapas concretas o la totalidad del ciclo viral. Estos sistemas permiten estudiar la entrada, la replicación, el ensamblaje y/o la secreción de viriones (**Figura E**), por lo que son fundamentales para estudiar las interacciones entre el virus y el huésped (198).



**Figura E – Sistemas celulares para el estudio *in vitro* del HCV.** El sistema de pseudopartículas del HCV (HCVpp) utiliza células 293T para producir partículas retrovirales pseudotipadas con las glicoproteínas virales del HCV que permiten el estudio de la entrada viral del HCV en células Huh7 o sus derivadas. Estas partículas retrovirales contienen un gen reportero que permite la identificación de las células infectadas. El replicón permite la expresión y autorreplicación estable del genoma de HCV en células Huh7 y sus derivadas. El sistema de cultivo celular del HCV (HCVcc) permite, tras electroporar el RNA viral en células Huh7, producir partículas virales asociadas a lipoproteínas que son capaces de reproducir el ciclo viral completo en células *naïve*. [Adaptado de Steinmann y Pietschmann, 2013 (198).]

## HCVpp

El sistema de pseudopartículas del HCV (HCVpp) es utilizado únicamente para el estudio de las etapas iniciales de la infección por el HCV de una forma independiente del resto del ciclo viral (12, 207, 217). La unión inicial y la internalización de estas pseudopartículas se hacen a través de glicoproteínas virales funcionales que reproducen la entrada natural del HCV pudiendo incluso ser neutralizadas con anticuerpos frente a E1 y E2 y con suero de pacientes (76, 207). La infección por HCVpp conlleva la liberación de una cápside retroviral en el citoplasma de la célula diana, siguiéndose posteriormente la expresión de un gen reportero, como luciferasa u otra proteína fluorescente, que permite una rápida detección de eventos de entrada productivos (198, 207). La gran limitación de las partículas HCVpp reside en que la asociación con las lipoproteínas no puede ser reproducida (207).

## Replicones

Los replicones son construcciones que fueron generadas a partir del RNA viral aislado de un paciente infectado con el HCV (120). Estas construcciones son capaces de replicarse autónomamente cuando son transfectadas en una línea celular de hepatoma ya que presentan mutaciones adaptativas que facilitan la replicación del HCV *in vitro* (102). Este sistema ha hecho posible la identificación de células permisivas a la replicación viral (23) y el estudio de determinantes tanto virales como celulares necesarios para la replicación del HCV, independientemente de la entrada y el ensamblaje viral (217). Los replicones pueden ser subgenómicos, presentando deleciones en las proteínas estructurales, p7 y NS2 en el genoma 1b del HCV (120) o genómicos, expresando el marco de lectura completo del HCV (169). Estos últimos replican eficientemente en cultivo celular pero no producen partículas víricas infecciosas, probablemente debido a que las mutaciones adaptativas que permiten su autorreplicación interfieren con la producción de partículas infecciosas o a que éstas no interaccionan con algún factor celular esencial para su formación (217). El desarrollo de los replicones genómicos facilitó la caracterización del primer genoma que replica *in vitro* sin necesidad de mutaciones adaptativas y que es la base para el sistema más ampliamente usado actualmente: el JFH-1 (94, 95).

## HCVcc

En 2005 varios laboratorios establecieron una cepa de HCV del genotipo 2a capaz de replicar y producir partículas infectivas en cultivo celular (HCVcc) (112, 210, 224). Esta



cepa representa la secuencia consenso del virus aislado a partir del suero de un paciente japonés con hepatitis fulminante (JFH-1, del inglés *Japanese Fulminant Hepatitis-1*). El sistema HCVcc permite producir auténticas partículas de HCV en líneas celulares hepáticas electroporadas *in vitro* con el RNA del aislado JFH-1 (207) siendo capaces de infectar células *naïve* y modelos animales susceptibles (217). Este sistema significó un avance crucial en la investigación del HCV ya que por fin se podía estudiar, al menos *in vitro*, todo el ciclo viral.

El sistema HCVcc ha permitido confirmar varios logros científicos incluyendo la identificación de los correceptores virales, inicialmente caracterizados usando proteínas recombinantes, anticuerpos y el sistema HCVpp (112). Posteriores mejoras en este sistema mediante la inserción de genes reporteros, del tipo luciferasa o la proteína verde fluorescente GFP, permitieron una rápida y sensible detección de la replicación e infección (207). Posteriormente, se han aislado otros clones como H77-S (genotipo 1a), JFH-2 (genotipo 2a), Con1 y NC1 (genotipo 1b), aunque sus títulos de virus obtenidos en cultivo celular siguen estando por debajo del JFH-1 (207).

Cabe destacar que el sistema JFH-1 *per se* no es el más optimizado para estudiar la replicación y propagación del HCV en cultivo celular (198). En este sentido, se han generado genomas quiméricos en los que las proteínas estructurales de otros genotipos del HCV se han fusionado a las proteínas no estructurales del JFH-1, ya que estas últimas son necesarias para una replicación más eficiente (168). La quimera J6/JFH-1 o Jc1 produce títulos virales superiores y es previsible que desplace, en algunas aplicaciones, al sistema JFH-1 en el futuro (168).

## Líneas celulares permisivas

Los hepatocitos humanos primarios son el sistema celular *in vitro* que mejor reproduce la infección natural del HCV en el hígado (198). Sin embargo, su uso es limitado ya que son difíciles de obtener y presentan una variabilidad elevada entre donantes. Además, la rápida pérdida de los marcadores de diferenciación hepatocitaria en cultivo supone un reto experimental añadido (198, 207). Estas limitaciones hacen que sean utilizados para la validación de resultados obtenidos en líneas celulares inmortalizadas (207).

La línea celular más utilizada para estudiar la infección *in vitro* del HCV es la línea Huh7 derivada de un hepatoma humano. Sin embargo, su alta variabilidad intrínseca, incluso entre lotes de células utilizadas en distintos laboratorios, unido a variables como el número de pases y la densidad celular, hace que los niveles de replicación y la eficiencia de infección no sean homogéneos (198). Como alternativa, se han

establecido varios clones derivados de Huh7 con elevada permisividad a la replicación como Huh7.5, Huh7.5.1 y Huh7-Lunet. En concreto, la línea Huh7.5 es altamente permisiva a la replicación del HCV, lo cual permite la generación de HCVcc con títulos suficientemente altos para generar una nueva infección en células *naïve* de manera reproducible, sensible y robusta. Varios sistemas reporteros, basados en la expresión estable de GFP, han sido ya establecidos en estas células con el objetivo de aumentar la rapidez y sensibilidad en la detección de eventos de infección (90).

Una desventaja de la línea Huh7 y sus derivadas es que no presentan una polaridad celular ni expresan los marcadores de diferenciación característicos de los hepatocitos humanos (46). El cultivo de Huh7 en Matrigel logra reproducir la arquitectura tridimensional y polarización celular típica de los hepatocitos, desarrollando unas estructuras semejantes a protocanículos biliares. En estas condiciones, se reproduce el ciclo infeccioso completo del HCV, generándose una progenie viral infecciosa y con propiedades fisicoquímicas semejantes a las de las HCVs (144).

Otra desventaja de la línea Huh7 es que la producción y secreción de VLDL está alterada y, como consecuencia, no producen verdaderas LVP (207). De hecho, la densidad de las partículas virales producidas en Huh7 es considerablemente más alta que las producidas en cultivos de hepatocitos primarios, ratones humanizados o chimpancés, siendo además su infectividad más baja (207). Continua siendo necesario desarrollar un modelo celular donde se produzcan VLDL maduras, se formen viriones que se asemejen a las LVP encontradas *in vivo* y con niveles suficientes para ser analizados.

## OBJETIVOS



## Objetivos

### **1. Estudiar el papel de clatrina en fases tardías del ciclo del HCV.**

- a. Analizar el posible papel de clatrina y de la proteína adaptadora AP-1 en el ensamblaje y salida del HCV.
- b. Estudiar el mecanismo a través del cual clatrina participa en las fases tardías del ciclo viral del HCV.

### **2. Caracterizar el papel de las apolipoproteínas B y E en la transmisión célula a célula del HCV.**

- a. Desarrollo de un sistema celular para el estudio la transmisión célula a célula del HCV.
- b. Análisis de papel de las apolipoproteínas B y E en la infección célula a célula del HCV.



## MATERIALES Y MÉTODOS





## Materiales y Métodos

### ***Líneas celulares***

En este trabajo se han utilizado las líneas celulares humanas Huh7 y sus derivadas, Huh7-Lunet-N, Huh7-Con1, Huh7.5, Huh7.5-GFP-MAVS, Huh7.5-shApoE y la línea celular 293T. Todas se cultivaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> con medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Gibco) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) (Lonza) y 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco) (medio completo).

#### **Huh7**

La línea celular hepática Huh7 (*Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank*®, JCRB0403) fue obtenida a partir de un carcinoma hepatocelular. Es una línea ampliamente utilizada en estudios *in vitro* de la infección por el HCV.

#### **Huh7.5**

Línea celular derivada de un clon de Huh7 que inicialmente expresaba un replicón genómico del HCV genotipo 1b que fue eliminado tras tratamiento con interferón alfa. Estas células son altamente permisivas a la replicación, por lo que se han utilizado para determinar la infectividad de sobrenadantes y lisados celulares. Las células Huh7.5 fueron cedidas por el Dr. Chisari (*Scripps Research Institute*, La Jolla, California, EEUU) para su uso en nuestro laboratorio.

#### **Huh7-Lunet-N**

Clon derivado de las células Huh7-Lunet. Su particularidad radica en que, mientras las Huh7-Lunet expresan bajos niveles del receptor viral CD81, en las Huh7-Lunet-N no se detecta su expresión lo que impide por completo la entrada viral. Estas células no se pueden infectar con HCVcc pero el RNA de HCV puede ser incorporado por métodos alternativos como la electroporación, generándose así nueva progenie viral infectiva. Línea cedida por el Dr. Pietschmann (*Twincore*, Hanover, Alemania).

#### **Huh7-Con1**

Clon celular obtenido tras la expresión estable de un replicón genómico del HCV genotipo 1b (Con1, EMBL: AJ238799) junto al gen de resistencia a neomicina/G418 en

la línea Huh7 (120). Los plásmidos con los replicones genómicos del HCV fueron cedidos por el Dr. Bartenschlager (*Heidelberg University*, Heidelberg, Alemania).

### **Huh7.5-GFP-MAVS**

Línea celular policlonal generada por transducción retroviral de la construcción GFP-MAVS en las células Huh7.5 siguiendo el protocolo descrito por Jones y colaboradores (90). El vector contiene la porción C-terminal de la proteína mitocondrial de señalización antiviral (MAVS, del inglés *Mitochondrial AntiViral-Signaling protein*), también llamada proteína estimuladora 1 del promotor de interferón beta (IPS-1, del inglés *Interferon-beta Promoter Stimulator-1*), sustrato natural de las proteasas virales NS3-4A, fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP). En células no infectadas, la fluorescencia se localiza en la mitocondria coincidiendo con la localización natural de la proteína MAVS. Tras la infección con HCVcc, las proteasas NS3-4A cortan MAVS liberándose así la GFP que es traslocada al citoplasma. Este sistema permite la identificación por microscopia de células infectadas por HCVcc. La selección de las células transfectadas es posible al poseer la construcción el gen de resistencia a neomicina/G418. Estas células fueron cedidas por nuestro colaborador el Dr. Koutsoudakis (IDIBAPS, Hospital Clínic, Barcelona).

### **Huh7.5-shApoE**

Estas células se generaron mediante transfección de células Huh7.5 con shRNA contra apoE y posterior selección con puromicina por nuestros colaboradores los Drs. Hishiki y Shimotohno (*Research Institute, Chiba Institute of Technology*, Narashino, Japón) (75).

### **293T**

La línea celular de riñón embrionario humano 293T (ATTC CRL-3216) fue cedida por la Dra. Paula Río Galdo (CIEMAT, Madrid) y utilizada exclusivamente para la producción de pseudopartículas retrovirales con proteínas de la envuelta de distintos virus (ver apartado *Generación de partículas retrovirales pseudotipadas*).

### **Cultivos polarizados de Huh7**

Para obtener cultivos celulares altamente polarizados, las células Huh7 fueron sembradas sobre Matrigel (BD Biosciences) siguiendo el protocolo descrito previamente por nuestro grupo (144) con algunas modificaciones. Concretamente, en primer lugar se depositó 100 µl de Matrigel al 50% en DMEM completo, en placas de

48 pocillos o en cámaras de 8 pocillos (Nalge Nunc International) y se incubó 30 min a 37°C. Posteriormente se sembraron  $5 \times 10^3$  células sobre este gel y se dejaron proliferar durante seis días. La polaridad epitelial de los cultivos se confirmó por inmunofluorescencia usando el marcador ZO-1.

## **Plásmidos y vectores retrovirales**

### **Plásmidos para la producción de partículas retrovirales pseudotipadas**

- **Empaquetamiento**

El plásmido pCMV-gag-pol codifica para la poliproteína retroviral *gag-pol* del HIV-1 que facilita la replicación y la encapsulación de las pseudopartículas. Fue cedido por el Dr. Cosset (*Université de Lyon*, Lyon, Francia).

- **Envueltas Virales**

El plásmido phCMV-H77 contiene la secuencia de las glicoproteínas E1 y E2 de la envuelta de un aislado del HCV genotipo 1a, cepa H77. El plásmido phCMV-RD114, contiene la secuencia de la envuelta del virus felino RD114. Estas construcciones fueron cedidas por el Dr. Cosset. El vector pVSV-G (Clontech Laboratories Inc.) codifica para la proteína G de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSV, del inglés *Vesicular Stomatitis Virus*). El vector pcDNA3.1 (+) (Invitrogen) es un vector vacío usado como control.

- **Vector de transferencia**

El vector pNL4.3R-E- luc fue cedido por el Dr. Landau a través del programa de reactivos del NIH AIDS. Contiene los elementos necesarios para generar un retrovirus defectivo de un solo ciclo de infección ya que, al carecer de las proteínas de la envuelta viral, no puede propagarse. Además codifica para la proteína bioluminescente luciferasa, utilizada para cuantificar la eficacia de la entrada viral.

### **Plásmido para la producción de HCV en cultivo celular**

El plásmido pJFH-1 ha sido utilizado para la producción de HCVcc tras electroporación de la línea Huh7 (ver apartado *Producción de HCV en cultivo celular*). Fue cedido por los Drs. Wakita y Rice a través de Apath, L.L.C New York, EEUU.

### **Plásmidos para la expresión ectópica de apoE**

Para expresar ectópicamente las distintas variantes de la isoforma 3 de apoE (apoE3) en las células Huh7.5-shApoE, se utilizaron plásmidos que permiten expresar apoE3 *wildtype*, pCAG-apoE3; apoE3 fusionada a la señal de retención en el RE KDEL,

pCAG-apoE3-KDEL; y el vector vacío, pCAG-control. Los plásmidos fueron cedidos por nuestros colaboradores los Drs. Hishiki y Shimotohno.

### ***Anticuerpos primarios y secundarios***

<b>NOMBRE</b>	<b>ESPECIE</b>	<b>CASA COMERCIAL</b>	<b>USO</b>
Anti-p53 (DO-1)	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	WB
Anti-alfa-1-antitripsina	Ratón	Abcam	WB
Anti-adaptina gama (AP-1)	Ratón	BD Biosciences	WB, IF
Anti-AP50 (AP-2 subunidad media)	Ratón	BD Biosciences	WB
Anti-apoB	Cabra	Calbiochem	WB, IF, IP
Anti-apoE	Cabra	Calbiochem	WB, IF, IP
Anti-CHC (cadena pesada de clatrina)	Conejo	Abcam	WB, IF
Anti-HCV core (C7-50)	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	WB, IF, ICQ
Anti-TfR1-FITC	Ratón	BD Biosciences	IF
Anti-ZO-1	Conejo	Life Technologies	IF
Anti-CD81 (clon 1.3.3.22)	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	IF
Anti-CD81 (clon 5A6)	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	WB
Anti-occludina	Conejo	Zymed	WB, IF
Anti-claudina-1	Conejo	Zymed	WB, IF
Anti-SR-BI	Conejo	Novus Biologicals	WB, IF
Anti-EEA1	Ratón	Cell Signaling Technology	WB, IF
Anti-LAMP1	Conejo	Abcam	WB, IF
Anti-ratón-HRP	Cabra	Invitrogen	WB, ICQ (secundario)
Anti-conejo-HRP	Cabra	Invitrogen	WB (secundario)
Anti-cabra-HRP	Conejo	Invitrogen	WB (secundario)
Anti-conejo-Alexa 488	Cabra	Molecular Probes, Inc.	IF (secundario)
Anti-ratón-Alexa 488	Cabra	Molecular Probes, Inc.	IF (secundario)
Anti-cabra-Alexa 647	Asno	Molecular Probes, Inc.	IF (secundario)
Anti-cabra-Alexa 568	Asno	Molecular Probes, Inc.	IF (secundario)
Anti-ratón-Alexa 568	Cabra	Molecular Probes, Inc.	IF (secundario)

NOMBRE	ESPECIE	CASA COMERCIAL	USO
Anti-conejo-Alexa 568	Cabra	Molecular Probes, Inc.	IF (secundario)
Anti-conejo-Alexa 647	Cabra	Molecular Probes, Inc.	IF (secundario)
IgG control	Cabra	Santa Cruz Biotechnology	IP

WB, western blot; IF, inmunofluorescencia; IP, inmunoprecipitación; ICQ, inmunocitoquímica.

## Western blot

Las células se lisaron con Laemmli 2X a 100°C, 5 min. Las proteínas de las muestras se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE en geles de acrilamida. Posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (BioRad) a 400 mA durante 1 h 30 min para proteínas de bajo peso molecular, o a 200 mA durante 16 h para proteínas de alto peso molecular. Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en solución salina *Tween-Tris* (T-TBS) durante 30 min a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios se incubaron a 4°C toda la noche y los secundarios a temperatura ambiente durante 45 min. En el revelado se utilizó el Kit *Supersignal West Chemiluminescent Reagent Dura, Pico o Femto* (ThermoScientific), dependiendo del caso. Las membranas se revelaron con películas radiográficas o con el instrumento *Intelligent Dark Box II* de Fujifilm. Para la obtención de la señal mediante densitometría se usó el software libre ImageJ 1.46r.

## Inmunofluorescencia

Para las inmunofluorescencias, las células se cultivaron sobre cubres o en cámaras de 8 pocillos, dependiendo del experimento. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato salino (PBS) a temperatura ambiente y se permeabilizaron con NP-40 al 0,1% en PBS. Posteriormente, las células se incubaron con la solución de bloqueo TNB (0,1 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 0,5% agente bloqueante de Boehringer Mannheim GmbH) durante 30 min a 37°C. Los anticuerpos primarios se incubaron durante 1 h y los secundarios 20 min, ambos a 37°C, en oscuridad y en cámara húmeda. Los núcleos se tiñeron con DAPI (Pierce). Los cristales se montaron usando el medio *Dako Fluorescent Mounting Medium* (DAKO) y las cámaras con PBS manteniendo así las muestras húmedas. Las preparaciones se analizaron con un microscopio confocal Leica TCS-SP5 (Leica Microsystems).

Para los estudios de colocalización, se hicieron 5 secciones ópticas del plano xy, espaciadas por 0,6-0,8  $\mu\text{m}$  en el plano z, en 20 células distintas. Los coeficientes de

Mander (fluorescencia del marcador A (*core*), que colocaliza con la fluorescencia del marcador B (AP-1, apoE, EEA1 y LAMP-1) se calcularon para cada célula usando el plugin JACoP del programa ImageJ.

### ***Producción de HCV en cultivo celular***

Para la generación de partículas de HCVcc se utilizó el plásmido pJFH-1 y el protocolo anteriormente publicado con algunas modificaciones (96).

#### **Digestión y preparación del plásmido pJFH-1**

20 µg del DNA plásmidico pJFH-1 fueron digeridos con la enzima de restricción XbaI (New England Biolabs). El producto de la reacción se purificó por extracción con 100 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 vol./vol./vol.) (Pierce). Se agitó con el vórtex y se centrifugó a 12000 g durante 15 min a temperatura ambiente. Se separó y se precipitó la fase acuosa con 0,1 vol. de acetato sódico 3 M, 3 vol. de etanol al 100% y 0,01 vol. de glicógeno (Invitrogen) a -70°C, 20 min. A continuación, se centrifugó el precipitado a 12000 g 20 min a 4°C y se resuspendió el *pellet* en 43 µL de agua libre de nucleasas (Ambion). Posteriormente, se incubó el DNA con la nucleasa Mung Bean (New England Biolabs) durante 30 min a 30°C. Pasado ese tiempo se incubó 1 h con proteinasa K (Invitrogen) a 50°C y se volvió a purificar por extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y precipitación con etanol. Se cuantificó la cantidad de DNA obtenida con NanoDrop y se guardó a -80°C hasta su uso posterior.

#### **Retrotranscripción y purificación**

Para la transcripción del DNA se usó el Kit *MegaScript T7* (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, el producto de la reacción se precipitó con cloruro de litio (Ambion) a -20°C durante 45 min. Después se centrifugó a 12000 g 15 min y se lavó el precipitado con 1 mL de etanol al 70%. El *pellet* se resuspendió en 11 µL de agua libre de nucleasas. Finalmente se cuantificó el RNA (NanoDrop) y se verificó el tamaño obtenido por electroforesis (aproximadamente 9000 pb).

#### **Electroporación**

Las células Huh7 se lavaron con OptiMEM I (Gibco) y se resuspendieron con tampón Cytomix [120 mM KCl; 0,15 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,6; 25 mM Hepes pH 7,6 (Lonza); 2 mM EGTA; 5 mM MgCl<sub>2</sub> pH 7,6; 5 mM glutatión; 2 mM ATP] (96) hasta una densidad final de 10x10<sup>6</sup> células/mL. Se preparó un tubo *eppendorf* con

5 µg de RNA JFH-1 y 400 µL de la suspensión de células ( $4 \times 10^6$  células). Esta mezcla se pasó a una cubeta de electroporación de 0,4 cm (BioRad) previamente enfriada sobre hielo. Las condiciones de electroporación usadas fueron 270 V y 975 µF en un equipo Gene Pulser II (BioRad). Las células electroporadas se mantuvieron durante 10 min en hielo para ser posteriormente sembradas en placas de 10 cm (Corning) usando medio DMEM con 10% de FBS sin antibióticos, incubándose durante 24 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo, el medio se cambió por DMEM completo. El sobrenadante de las células electroporadas que contenían HCVcc, fue filtrado a través de una membrana con poros de 0,45 µm (VWR International) y congelado a -80°C hasta su utilización. Esta operación se repitió durante 4-5 días consecutivos, tras los cuales el cultivo celular fue descartado. El título viral fue determinado mediante titulación de diluciones seriadas de los distintos sobrenadantes en células Huh7 *naïve* y posterior inmunocitoquímica frente a la proteína viral *core* (ver apartado *Determinación de la infectividad viral: por inmunocitoquímica*).

### ***Generación de partículas retrovirales pseudotipadas***

El protocolo de generación de pseudopartículas de HCV (HCVpp) está basado en el descrito por Bartosch y colaboradores (12). El día anterior a la transfección, las células 293T ( $3 \times 10^6$ ) fueron sembradas en placas de 10 cm recubiertas de poli-L-lisina (Sigma). En el día de la transfección se prepararon 2 tubos:

1) Tubo A:

- 36 µL de CaCl<sub>2</sub> 2M;
- 10 µg del plásmido pNL4.3R-E- luc;
- 10 µg del plásmido pHCMV-H77; pHCMV-RD114; pVSV-G o pcDNA3.1 (+);
- 8 µg del plásmido pCMV-gag-pol;
- agua estéril hasta 300 µL totales.

2) Tubo B:

- 300 µL de HBS (HEPES *Buffered Saline*) 2X (Sigma).

A continuación, se vertió gota a gota el contenido del tubo A sobre el tubo B usando el vórtex a muy baja velocidad y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Se añadió esta mezcla gota a gota a las 293T y se incubaron toda la noche. Pasadas 24 h se lavaron las células con PBS con cationes Mg<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup> (Midimed) y se volvieron a incubar con medio completo. Los sobrenadantes de las células 293T, con las distintas

pseudopartículas, se recogieron 48 y 72 h tras la transfección y fueron filtrados a través de membranas con poros de 0,45 µm y congelados a -80°C hasta su uso.

### **Silenciamiento de proteínas usando siRNA**

Las células fueron transfectadas usando siRNA *ON-TARGETplus Smartpool* (Dharmacon) dirigidos contra los genes que codifican las siguientes proteínas: apolipoproteína B (apoB), apolipoproteína E (apoE), cadena pesada de clatrina (CHC, del inglés *Clathrin Heavy Chain*), subunidad gamma-1 de AP-1 (AP1G1), subunidad media de AP-2 (AP2M1) y CD81, utilizando como control la mezcla *Non-targeting pool*. Alternativamente fueron utilizados siRNA *ON-TARGETplus Set-of-4* (Dharmacon) constituidos por cuatro secuencias individuales distintas frente a CHC, apoB y apoE utilizándose como control una secuencia individual *Non-targeting*. La concentración final de siRNA en el pocillo fue de 200 nM en el medio OptiMEM I suplementado con 10% de FBS. Como reactivo de transfección se usó Dharmafect-1 (Dharmacon) según las instrucciones del fabricante. Las células junto con la mezcla de transfección se incubaron durante toda la noche, renovándose el medio de cultivo por DMEM completo a la mañana siguiente.

### **Expresión ectópica de apoE en células Huh7.5-shApoE**

Los plásmidos pCAG-control (vector vacío), pCAG-apoE3-KDEL y pCAG-apoE3 fueron transfectados siguiendo el protocolo descrito por Hishiki y colaboradores (75). Brevemente, se transfectaron  $2 \times 10^5$  de células Huh7.5-shApoE con 2,5 µg de DNA plasmídico en 250 µL de OptiMEM I utilizando 7,5 µL del reactivo de transfección TransIT®-LT1 (Mirus) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### **Ensayos de luciferasa para el estudio de la entrada viral**

Para estudiar la entrada viral, se transfectaron  $3 \times 10^5$  células Huh7 con los siRNA *Smartpool* frente a apoB, apoE, CD81 y control. Pasadas 24 h, las células se pasaron a placas de 96 pocillos (Corning) a una densidad de  $10^4$  células/pocillo. Al día siguiente se infectaron con partículas retrovirales pseudotipadas con las proteínas de la envuelta de VSV, RD114, H77, y control (ver apartado anterior: *Generación de partículas retrovirales pseudotipadas*). Dos días después las células fueron lisadas con 30 µl/pocillo de la solución de lisis *Passive Lysis Buffer* de Promega. La actividad de la



luciferasa fue determinada usando el Kit *Luciferase Assay System* (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante en un luminómetro Sirius Single Tube (Berthold Detection Systems GmbH).

### ***Estudio de la replicación viral***

Para estudiar la replicación viral del HCV se sembraron  $2 \times 10^5$  células Huh7-Con1 en placas de 48 pocillos (Corning). Tras 24 h, las células se transfectaron con los siRNA *Smartpool* control, apoB, apoE, CHC y AP1G1. Finalmente las células se lisaron con 500  $\mu$ L de TriReagent (Vitro) 24, 48 y 72 h después de la transfección para extraer RNA y cuantificar los niveles de RNA viral por qPCR (ver apartado *Análisis de la expresión de RNA viral por PCR cuantitativa*).

### ***Estudio de la salida viral***

Para estudiar el ensamblaje y/o salida viral se empleó el sistema de HCVcc generadas con el RNA de JFH-1 (ver anterior apartado: *Producción de HCV en cultivo celular*) y las líneas celulares Huh7 y Huh7-Lunet-N utilizando dos abordajes distintos: silenciamiento transitorio mediante siRNA e inhibición farmacológica.

### **Experimentos con silenciamientos**

Las células Huh7 se sembraron a una densidad de  $10^5$  células/pocillo en placas de 6 pocillos (Corning). Al día siguiente se infectaron con una multiplicidad de infección (MOI, del inglés *Multiplicity Of Infection*) de 0,01 de HCVcc. Tres días después, se transfectaron con los siRNA *Smartpool* control, CHC, AP1G1, AP2M1, apoB o apoE o *Set-of-4* CHC y secuencia individual control.

Las células Huh7-Lunet-N fueron electroporadas con el RNA JFH-1 en las mismas condiciones descritas en el apartado *Producción de HCV en cultivo celular: Electroporación*. Tras 24 h, fueron sembradas a una densidad de  $3 \times 10^5$  células/pocillo en placas de 6 pocillos y transfectadas con los siRNA *Smartpool* control, CHC y AP1G1.

En ambos casos, después de dos días, las células se lavaron y se incubaron con medio completo durante 6 h. Finalmente, se recogieron los sobrenadantes y se filtraron a través de una membrana de 0,45  $\mu$ m guardándose a  $-80^\circ\text{C}$ . En éstos se determinó la infectividad viral, el RNA viral y/o los niveles de apoE y apoB dependiendo del experimento. Por otro lado, se recogieron las células, donde además

de determinar los parámetros anteriormente mencionados se estimó la eficacia de los distintos silenciamientos por Western blot.

### **Experimentos de inhibición farmacológica**

En los experimentos de inhibición farmacológica, 5 días después de la infección por HCVcc en Huh7 y 3 días después de la electroporación del JFH-1 en Huh7-Lunet-N, las células fueron tratadas con 50  $\mu$ M de pitstop2 (Abcam) (209), 80  $\mu$ M de dynasore (Sigma) (115) o 1  $\mu$ g/ml de brefeldina A (BFA) (65) (Sigma) durante las 6 h previas a la recogida de sobrenadantes y células.

### **Inmunoprecipitación**

La proteína G-sefarosa *Fast flow 4* (GE Healthcare Life Sciences) se resuspendió en PBS suficiente para obtener una suspensión al 50%. Los anticuerpos de cabra anti-apoB, anti-apoE y el control IgG de cabra fueron incubados a una concentración de 2,5  $\mu$ g de anticuerpo por cada 100  $\mu$ l de suspensión de proteína G-sefarosa al 50% durante 30 min a temperatura ambiente en un agitador orbital. El exceso de anticuerpos no ligados a la proteína G-sefarosa se eliminó mediante 3 lavados con PBS frío. Después, se añadió una cantidad calculada de PBS para que la sefarosa quede al 50%. Los sobrenadantes y/o lisados celulares fueron preaclarados con 100  $\mu$ l de la suspensión al 50% de proteína G-sefarosa durante 1 h a 4°C en un agitador orbital. A continuación, se tomaron alícuotas de la suspensión preaclarada (*inputs*) por triplicado para determinar la cantidad de RNA viral inicial. La inmunoprecipitación se realizó incubando 500  $\mu$ L de la muestra preaclarada con 40  $\mu$ l de la mezcla proteína G-sefarosa-anticuerpo durante 3 h a 4°C en agitación orbital. Tras la inmunoprecipitación, la fracción no unida a los anticuerpos fue titulada en células Huh7 *naïve* (ver siguiente apartado). Los inmunoprecipitados fueron lavados 3 veces con PBS. Una fracción de estos inmunoprecipitados fue eluída con Laemmli 2X y utilizada para Western blot y otra lisada con TRIzol LS (Life Technologies) para determinar la cantidad de RNA viral por RT-qPCR (ver apartado: *Análisis de la expresión de RNA viral por PCR cuantitativa*).

### **Determinación de la infectividad viral**

Para determinar la infectividad intracelular, las células se sometieron a 4 ciclos de congelación (con hielo seco) y descongelación (baño a 37°C) de 5 min cada uno. Este

proceso permite romper la membrana de las células posibilitando la liberación de las partículas intracelulares sin destruir la envuelta viral (67). Los extractos se centrifugaron 5 min a 700 g y se recogieron los sobrenadantes, donde las partículas virales intracelulares quedan suspendidas.

Para la determinación de la infectividad extracelular se usaron sobrenadantes filtrados con membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro para eliminar restos celulares.

### **Por PCR cuantitativa**

La titulación de las partículas víricas intra o extracelulares se realizó mediante infección de  $2 \times 10^4$  células Huh7 *naïve* sembradas en placas de 48 pocillos con una dilución de estas partículas (1:10 o 1:20 dependiendo de los casos). Tras 3 días de infección, las células se lisaron con 500  $\mu\text{L}$  de TRIreagent (Viro) para posterior extracción de RNA y cuantificación por RT-qPCR (ver apartado: *Análisis de la expresión de RNA viral por PCR cuantitativa*).

### **Por inmunocitoquímica**

En este caso, se usaron células Huh7.5 *naïve* que fueron incubadas con diluciones seriadas (1:5; 1:25; 1:125) de los lisados celulares y sobrenadantes que contenían partículas víricas. Tras 72 h de infección, se fijaron con etanol frío al 100% durante 10 min y se bloquearon con una solución de albúmina de suero bovino (BSA) (Roche) al 3% en PBS durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron con el anticuerpo primario de ratón anti-core diluido 1:200 en BSA al 1% en PBS y seguidamente con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a HRP diluido 1:400 en BSA 1% en PBS, ambos durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó con el sustrato de la peroxidasa AEC/DMF [50 mM NaOAc pH 5,0; 500  $\mu\text{L}$  de la disolución de una pastilla de 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) (Sigma) en 2,5 mL de dimetilformamida (DMF) (Sigma); 0.015%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Sigma)] 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Pasado el tiempo de incubación se lavó con agua destilada y se contaron las unidades formadoras de foco (FFU, del inglés *Focus Forming Units*) utilizando microscopio óptico.

## ***Análisis de la expresión de RNA viral por PCR cuantitativa***

### **Extracción de RNA**

Para la determinación de RNA extracelular, los sobrenadantes filtrados producidos por células infectadas fueron incubados con 3 vol. de TRIzol LS Reagent (Life

Technologies). Para la determinación de RNA intracelular, las células fueron lisadas con 5 vol. de TRIreagent (Vitro). Posteriormente, en ambos casos se añadió 1/5 vol. de cloroformo, se agitó en el vórtex 20 s y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Esta mezcla se centrifugó a 9000 g durante 15 min a 4°C. Se recogieron aproximadamente 200 µL de la fase acuosa superior y se añadió 1 vol. de isopropanol absoluto. Se mezcló por inversión de los tubos y se centrifugó a 9000 g, 15 min a 4°C. Se resuspendió el *pellet* en 500 µL de etanol al 70% frío y se volvió a centrifugar a 9000 g durante 5 min a 4°C. Finalmente, los *pellets* se secaron a temperatura ambiente y se resuspendieron en 20 µL de agua estéril y libre de RNAsas mediante incubación a 65°C, 5 min y se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso.

### Retrotranscripción

Para copiar los RNA obtenidos anteriormente a los DNA complementarios (cDNA), realizamos una reacción de retrotranscripción (RT). Con este fin, se preparó la mezcla para la reacción en un total de 12 µL por pocillo de la siguiente forma:

REACTIVO	VOLUMEN POR REACCIÓN (µL)
Tampón 10X (Applied Biosystems)	4
Mg <sup>2+</sup> 25 mM (Roche)	2
dNTPs 2,5 mM (Promega)	1,5
Random Hexamers 50 mM (Applied Biosystems)	2
Enzima AMV-RT 10 U/µL (Promega)	1
Inhibidor RNasin® 40 U/µL (Promega)	0,5
H <sub>2</sub> O estéril	5

A continuación se añadió 8 µL del RNA obtenido anteriormente. Las condiciones usadas para la RT fueron las siguientes: 1 h a 42°C; 30 min a 52°C; 3 min a 99°C; ∞ a 4°C. Finalizada la RT, los cDNA fueron guardados a -20°C hasta su cuantificación por PCR cuantitativa.

### PCR cuantitativa

Para la PCR cuantitativa (qPCR) se usó el Kit *LightCycler FastStart DNA Master Sybr Green I* (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante, en un termociclador de capilares *LightCycler® 2.0* (Roche). Tras la cuantificación, los resultados se normalizaron en referencia a la expresión del gen de la histona H3 humana. La secuencia de los oligonucleótidos (*primers*) utilizados aparecen en la siguiente tabla.

Primer	Secuencia 5'→3'
HCV 5'UTR FW	cctgtgaggaactactgtct
HCV 5'UTR RV	ctatcaggcagtaccacaag
H3 FW	aaagccgctcgcaagagtgcg
H3 RV	acttgcctcctgcaaagcac

FW: *forward*; RV: *reverse*

El programa usado para la qPCR de HCV fue el siguiente:

- 1- Activación de la polimerasa: 95°C x 10 min
- 2- PCR de 40 ciclos: 95°C x 0  
56°C x 10 s  
72°C x 10 s  
87°C x 1 min (con adquisición)
- 3- Desnaturalización: 95°C x 0  
60°C x 1 min  
95°C x 0 (con adquisición continua)
- 4- Enfriamiento: 40°C x 5 s

En el caso de la qPCR para H3 se programó como sigue:

- 1- Activación de la polimerasa: 95°C x 10 min
- 2- PCR de 35 ciclos: 95°C x 0  
62°C x 10 s  
72°C x 10 s (con adquisición)
- 3- Desnaturalización: 95°C x 0  
60°C x 1 min  
95°C x 0 (con adquisición continua)
- 4- Enfriamiento: 40°C x 5 s

Para el cálculo de la cantidad de RNA viral se utilizó una curva patrón elaborada para tal efecto. Para su representación se empleó un método de cuantificación relativa, atribuyéndole el valor arbitrario de 1 a la condición control y calculándose las restantes condiciones problema con el método automático del software LightCycler 4.1v (Roche).

### **Ensayos de proliferación celular**

Se sembraron  $10^4$  células en placas de 96 pocillos y al día siguiente se transfectaron con los siRNA *Smartpool* control, apoB, apoE, CHC o AP1G1. El MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol) (Sigma) se añadió a cada pocillo a una concentración final de 0,5 mg/mL en medio RPMI-1640 completo sin rojo-fenol (Lonza). Las células fueron incubadas durante 3 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después se aspiró el medio, se añadió 100 µL de 0,1N HCl en isopropanol absoluto a cada pocillo. La absorbancia fue medida a una longitud de onda de 570 nm en un lector de ELISA Sunrise Basic Tecan (Tecan Austria GbmH), interpolándose los datos a una curva patrón con una dilución seriada de las células utilizadas.

### **Titulación de anticuerpos**

Para la titulación de los anticuerpos monoclonal humano AR3a (69, 105) o policlonal de cabra anti-apoE (Calbiochem), se incubaron células Huh7.5-GFP-MAVS infectadas con HCVcc (MOI: 0,01) con concentraciones crecientes de los anticuerpos a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Las células fueron fijadas con etanol absoluto frío tras 72 h de infección y procesadas como descrito en el apartado: *Determinación de la infectividad viral: por inmunocitoquímica*.

### **Ensayos de transmisión viral célula a célula**

Se sembraron  $3 \times 10^4$  de células Huh7.5-GFP-MAVS en cámaras de 8 pocillos. Al día siguiente se infectaron con HCVcc (MOI: 0,003) y 6 h más tarde se transfectaron con los siRNA *Smartpool* o *Set-of-4* control, apoB y apoE. Pasadas 24h las células fueron lavadas e incubadas con: 1) DMEM completo; 2) DMEM completo con 1% de agarosa de bajo punto de fusión (EcoGen); 3) DMEM completo con 50 µg/mL del anticuerpo monoclonal humano AR3a; o 4) DMEM completo con 100 µg/mL del anticuerpo policlonal de cabra anti-apoE dependiendo del experimento. Pasadas 72 y 96 h de la infección con HCVcc, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4%, teñidas con DAPI y analizadas en un microscopio confocal Leica TCS-SP5 con el objetivo de 40x. Finalmente, se contabilizó el número de células por foco de infección en aquellas células Huh7.5-GFP-MAVS donde se constató una traslocación de la proteína GFP en el citoplasma, en un total de diez fotos consecutivas, con al menos un foco, en pocillos duplicados para cada condición experimental.

## **Ensayos de cocultivo celular**

Los ensayos de cocultivo celular, en los que dos tipos celulares distintos o el mismo tipo celular en dos condiciones experimentales distintas son cultivados a la vez en la misma placa, se utilizaron para evaluar en detalle el papel de las apolipoproteínas en el paso célula a célula del HCV. Para ello, se usaron como donadoras las células Huh7 infectadas con HCVcc y como aceptoras las células Huh7.5-GFP-MAVS. Ambos tipos celulares fueron transfectados con los siRNA *Smartpool* control, apoB y apoE antes de comenzar el cocultivo. Alternativamente se utilizaron como donadoras las células Huh7.5-shApoE transfectadas con vector vacío, apoE3 o apoE3-KDEL (ver apartado: *Expresión ectópica de apoE en células Huh7.5-shApoE*) y posteriormente infectadas con HCVcc.

Se utilizó un ratio de 1:25 de células donadoras:aceptoras y se sembraron un total de  $5 \times 10^4$  de células/pocillo en cámaras de 8 pocillos. Pasadas 6 h, las células fueron incubadas con 1% de agarosa de bajo punto de fusión en DMEM completo durante 24 o 48 h según el experimento. Transcurrido este tiempo, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y se procedió a la inmunofluorescencia de la proteína viral core. La infección por paso célula a célula fue determinada en un microscopio confocal Leica TCS-SP5 y expresada como el porcentaje de células donadoras que habían transmitido el virus a una célula aceptora (identificada por la traslocación de la GFP), respecto al total de donadoras analizadas.

## **Determinación de la secreción de apolipoproteínas por ELISA**

Para el estudio de la secreción de apoB y apoE, se utilizaron los kits de ELISA (del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) para apoB y apoE humanas de Abnova siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando los sobrenadantes y lisados celulares recogidos en los experimentos de salida viral descritos anteriormente (ver apartado *Estudio de la salida viral*).

## **Análisis estadístico**

Los resultados presentados en las gráficas de columnas y de líneas están representados como la media aritmética más la desviación estándar respecto al control, excepto cuando indicado en contrario en el pie de figura. En las gráficas tipo “nubes de puntos” está representada la mediana como una línea horizontal gris. La comparación entre grupos fue realizada mediante las pruebas Mann-Whitney, Kruskal-

Wallis o ANOVA dependiendo de los casos y está indicada en los pies de figura respectivos. En este trabajo se ha considerado como estadísticamente significativo una p menor de 0,05 (\*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ ). El análisis de los datos se realizó con el programa estadístico GraphPad Prism 5 (GraphPad Software).



## RESULTADOS



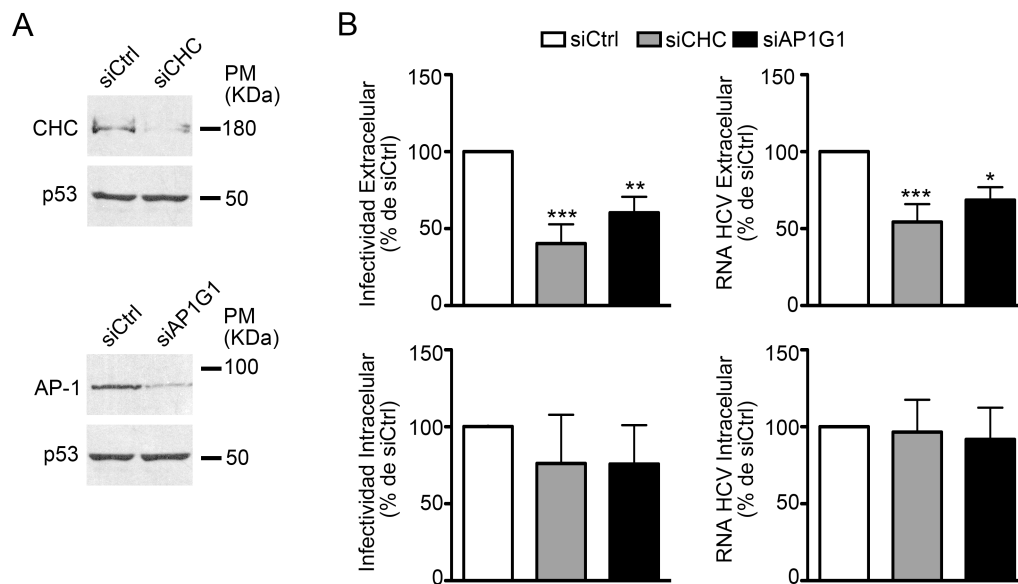
## Resultados

### ***Caracterización del papel de clatrina en fases tardías del ciclo del HCV***

El tráfico de vesículas recubiertas de clatrina es posible gracias a la participación de varias proteínas adaptadoras, incluyendo AP-1 y AP-2 (31). AP-1 está involucrada en el tráfico de proteínas hacia la membrana plasmática mientras que AP-2 está implicada en procesos endocíticos (182). Clatrina es utilizada por distintos tipos de virus para facilitar la entrada o la secreción de nuevos viriones (77, 81, 139). En concreto, la entrada del HCV al interior de los hepatocitos mediante endocitosis es un proceso dependiente de clatrina que ha sido ampliamente documentado (22, 137). Sin embargo, la posible participación de clatrina y proteínas asociadas en otras fases del ciclo del HCV no ha sido estudiada, por lo que en este trabajo nos hemos propuesto estudiar el papel de clatrina y su adaptador AP-1 en las fases tardías del ciclo del HCV.

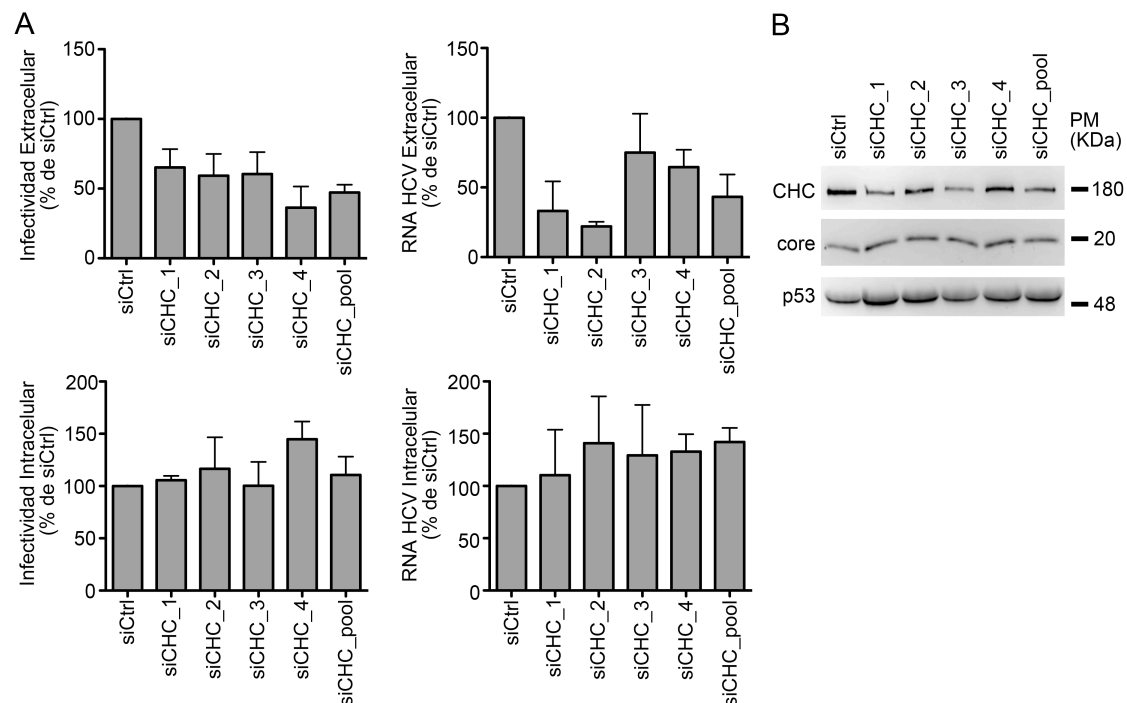
#### **Clatrina y su proteína adaptadora AP-1 median la salida de HCVcc**

En primer lugar, para estudiar la salida del HCV, utilizamos células Huh7 permanentemente infectadas con HCVcc que fueron posteriormente transfectadas con siRNA *Smartpool* dirigidos contra la cadena pesada de clatrina (CHC) y la subunidad gamma-1 de AP-1 (AP1G1). De esta forma, las células ya se encuentran replicando y produciendo virus antes de la transfección, por lo que los posibles efectos causados por los silenciamientos se deberían restringir a las fases tardías de la infección. Los niveles de RNA viral e infectividad fueron analizados por qPCR en los lisados celulares y los sobrenadantes recogidos dos días después de la transfección. La eficacia del silenciamiento de la expresión de CHC y AP-1 se confirmó mediante Western blot (**Figura 1A**). En la **Figura 1B**, se puede observar que tanto la infectividad como los niveles de RNA extracelulares se redujeron significativamente en las células con silenciamiento en CHC o AP1G1 en comparación con el silenciamiento control. Además, ni la infectividad ni los niveles de RNA intracelulares se modificaron significativamente. Estos datos sugieren que tanto clatrina como AP-1 están implicadas en la secreción de viriones.



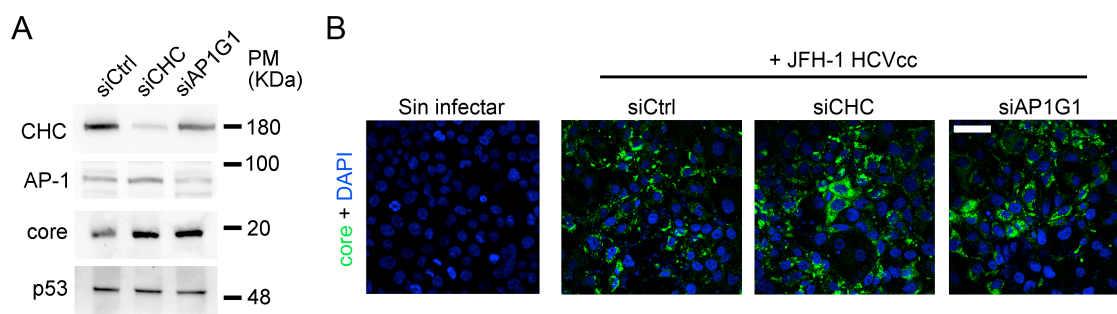
**Figura 1 – La secreción de HCVcc es dependiente de clatrina y AP-1.** (A) Análisis por Western blot de la eficacia del silenciamiento de CHC (siCHC) y AP1G1 (siAP1G1) en células Huh7 permanentemente infectadas con HCVcc. p53 fue utilizado como control de carga. (B) Cuantificación por qPCR de la infectividad y RNA virales en células Huh7 silenciadas de CHC o AP1G1. Los resultados corresponden a tres experimentos por triplicado. La significación estadística fue determinada mediante la prueba ANOVA.

Estos resultados fueron confirmados repitiendo los mismos experimentos utilizando cuatro siRNA individuales (*Set-of-4*) específicos para CHC (**Figura 2**).



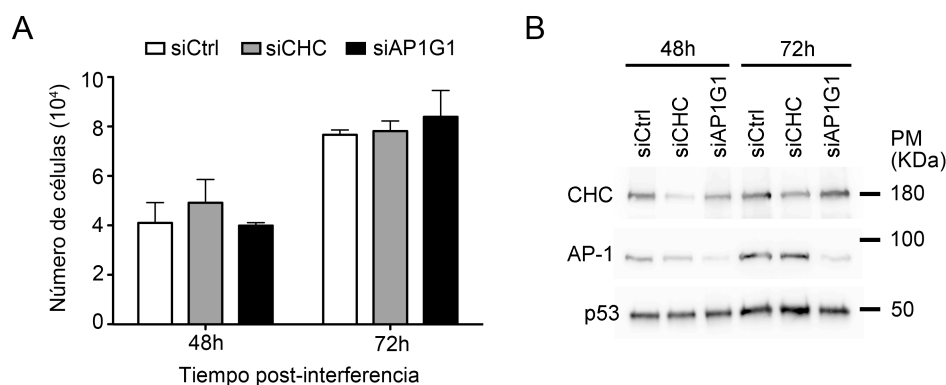
**Figura 2 – (A)** Cuantificación de la infectividad y RNA virales tras la transfección de cuatro siRNA individuales para CHC en células Huh7 permanentemente infectadas con HCVcc. Las gráficas muestran los resultados de un experimento por triplicado. **(B)** Análisis por Western blot del silenciamiento de clatrina y de los niveles intracelulares de la proteína viral core utilizando p53 como control de carga.

Para comprobar si la infección por HCV no se vió afectada por los silenciamientos, determinamos los niveles de acumulación de la proteína viral *core* por Western blot (**Figura 3A**) y por inmunofluorescencia (**Figura 3B**) en las células Huh7 transfectadas con los siRNA *Smartpool* frente a CHC y AP1G1. Los resultados no evidencian cambios tras los silenciamientos respecto al control.



**Figura 3** – (A) Niveles de *core* intracelular analizados por Western blot en células Huh7 permanentemente infectadas con HCVcc y transfectadas con los siRNA *Smartpool* frente a CHC y AP1G1. p53 fue utilizado como control de carga. (B) Acumulación de *core* analizada por microscopia tras inmunofluorescencia. Azul (DAPI): núcleos; Verde: *core*. Barra: 50  $\mu$ m.

Seguidamente se estudió el efecto de la disminución de clatrina y AP-1 en la proliferación celular realizando ensayos de MTT en células Huh7, en los que no se observó ninguna diferencia significativa respecto al control (**Figura 4**).

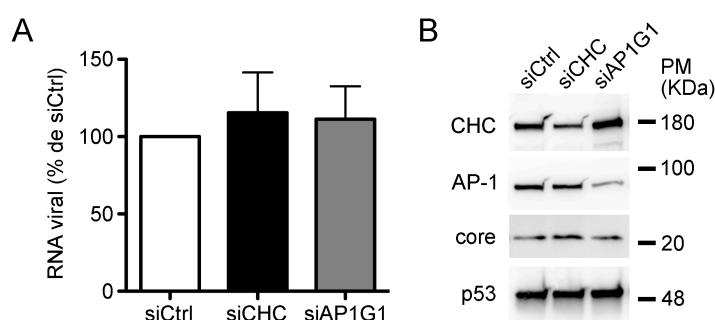


**Figura 4** – El silenciamiento de clatrina y AP-1 no afecta a la proliferación celular. (A) Proliferación de células Huh7 transfectadas con siRNA frente a CHC y AP1G1 durante 48 y 72 h. Los resultados corresponden a tres experimentos por triplicado y las diferencias no son estadísticamente significativas según el test de Mann-Whitney. (B) El Western blot demuestra la eficacia del silenciamiento de CHC y AP1G1. p53 se utilizó como control de carga.

En conjunto, estos datos indican que las diferencias observadas en los niveles de infectividad y RNA viral extracelulares (**Figura 1 y 2**) no son debidas a una

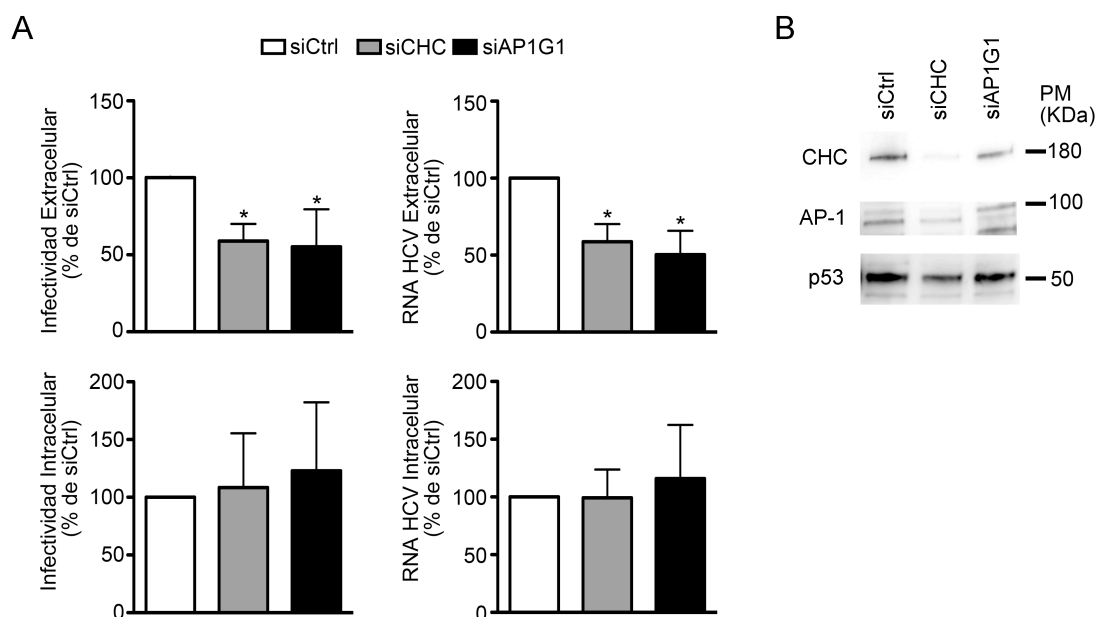
propagación ineficaz de la infección ni a una disminución de la proliferación celular causadas por el silenciamiento de la expresión de clatrina o AP-1.

Para descartar cualquier efecto del silenciamiento de clatrina y AP-1 en la replicación del HCV que pudiera afectar a nuestros resultados, realizamos ensayos de replicación viral utilizando las células Huh7-Con1, que expresan el replicón genómico del HCV 1b, y cuantificamos los niveles de RNA viral tras el silenciamiento de CHC y AP1G1. Los datos de la **Figura 5** muestran que los niveles intracelulares de RNA viral y de la proteína *core* no se modifican tras la interferencia de CHC y AP1G1, sugiriendo que estas proteínas no están implicadas en la replicación viral.



**Figura 5 – La replicación del HCV no es dependiente de clatrina ni AP-1.** (A) Cuantificación por qPCR de los niveles intracelulares de RNA viral en las células Huh7-Con1 con silenciamiento en CHC (siCHC) y AP1G1 (siAP1G1). La gráfica muestra los resultados de dos experimentos por triplicado. (B) Análisis por Western blot de la expresión de las proteínas silenciadas y de la proteína viral *core* en células Huh7-Con1. p53 fue analizado como control de carga.

Como clatrina es esencial para la endocitosis del HCV (22, 137), el silenciamiento de clatrina podría estar también afectando la entrada viral en los experimentos con células permanentemente infectadas, dificultando así la interpretación de nuestros datos. Para descartarlo utilizamos otro abordaje experimental con células Huh7-Lunet-N. En estas células no se produce la entrada de viriones de HCVcc ya que no expresan el correceptor CD81 (21). Sin embargo, cuando son electroporadas con el RNA viral JFH-1 son capaces de secretar viriones infectivos, característica que las convierte en una herramienta ideal para estudiar la exocitosis del HCVcc tras una sola ronda de infección. Al igual que en células Huh7, el silenciamiento de CHC y AP1G1 en Huh7-Lunet-N bloqueó la secreción de HCVcc sin afectar los niveles de infectividad y RNA intracelulares (**Figura 6**), confirmándose así que clatrina y AP-1 participan en la salida del HCVcc.

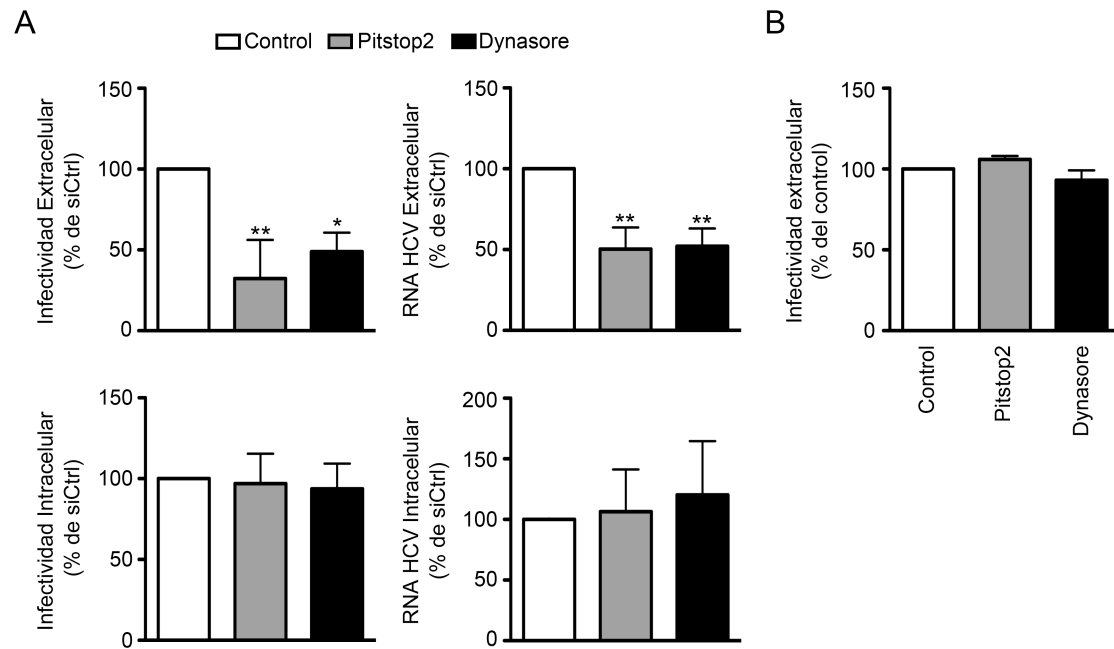


**Figura 6** – (A) Cuantificación por qPCR de la infectividad y los niveles de RNA del HCV tras el silenciamiento de CHC (siCHC) y AP1G1 (siAP1G1) en células Huh7-Lunet-N electroporadas con el RNA JFH-1. Los resultados corresponden a tres experimentos por triplicado. La significación estadística fue determinada mediante la prueba ANOVA. (B) Análisis por Western blot del silenciamiento de clatrina y AP-1 en células Huh7-Lunet-N. p53 fue analizado como control de carga.

### La secreción de HCVcc es dependiente de clatrina y dinamina

A continuación estudiamos si la inhibición farmacológica de clatrina también bloqueaba la exocitosis del HCVcc. Para ello se trataron células Huh7-Lunet-N electroporadas con el RNA JFH-1 con el inhibidor de clatrina pitstop2 (209). Los resultados demuestran que el tratamiento con pitstop2 disminuyó significativamente la secreción de HCVcc, sin alterar sus niveles intracelulares (**Figura 7A**).

Paralelamente se evaluó el papel de dinamina utilizando el inhibidor dynasore (127). Dinamina es una GTPasa esencial en eventos que implican escisión de membranas durante procesos celulares que dependen de la formación de vesículas (58). También participa en la endocitosis mediada por clatrina y en el tráfico de vesículas desde la TGN (24). Además dinamina también interviene en la internalización del HCV (117). Su inhibición farmacológica redujo los niveles de infectividad y RNA extracelulares del HCV sin modificar los niveles intracelulares (**Figura 7A**).



**Figura 7 – La inhibición de clatrina y dinamina bloquea la secreción de HCVcc.** (A) Cuantificación por qPCR de la infectividad y RNA virales en células Huh7-Lunet-N tratadas con 50  $\mu$ M de pitstop2 o 80  $\mu$ M de dynasore durante 6 h. Las gráficas muestran los resultados de cuatro experimentos por triplicado. La significación estadística fue determinada mediante la prueba ANOVA. (B) Análisis del efecto de los inhibidores pitstop2 y dynasore durante la titulación de sobrenadantes infectivos sobre células Huh7 *naïve*.

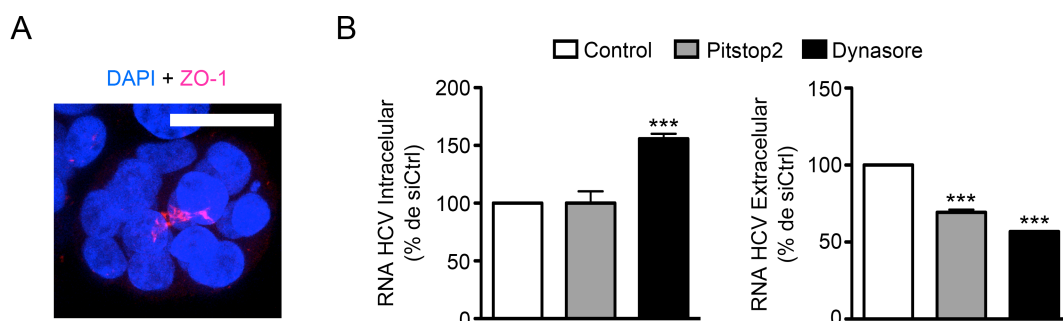
Como la entrada del HCV es un proceso dependiente de clatrina y dinamina, se evaluó la posibilidad formal de que la reducción observada en las infectividades extracelulares en células tratadas con los inhibidores fuese debida no a cambios reales en la secreción sino a la presencia de trazas de pitstop2 o dynasore en los sobrenadantes que afectaran la entrada de los virus al ser titulados en células Huh7 *naïve*. Considerando el escenario más desfavorable, se añadió el 100% de la concentración utilizada del inhibidor a sobrenadantes con HCVcc. Esta mezcla se tituló sobre células Huh7 *naïve*, no observándose ningún efecto de ambos inhibidores en la infectividad viral (**Figura 7B**). Estos datos demuestran que los resultados de la **Figura 7A** no son causados por la presencia de inhibidores en los sobrenadantes titulados que hubieran impedido la entrada viral, sino a una secreción deficiente de HCVcc en las células tratadas.

### Confirmación del papel de clatrina y dinamina en cultivos polarizados de Huh7

Los cultivos polarizados de Huh7 fueron obtenidos utilizando células Huh7 incluidas en Matrigel. Estos cultivos lograron la formación de agregados celulares tridimensionales



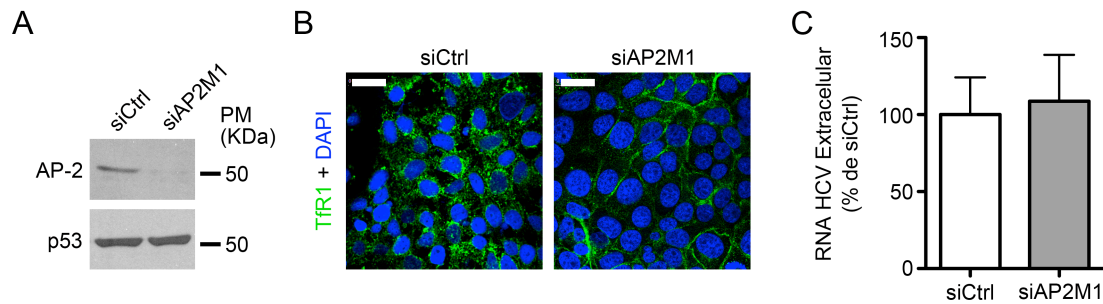
en los que las células presentaban una polarización similar a la de los hepatocitos en el parénquima hepático (144) (**Figura 8A**). El bloqueo de la salida del HCVcc causado por los inhibidores pitstop2 y dynasore se confirmó en este modelo celular (**Figura 8B**).



**Figura 8 – La secreción de HCVcc está mediada por clatrina y dinamina en cultivos polarizados de Huh7.** (A) Localización polarizada de ZO-1 (magenta) en células Huh7 cultivadas en Matrigel. Azul (DAPI): núcleos. Barra: 25 μm. (B) Efecto de pitstop2 y dynasore en los niveles de RNA viral intra y extracelular en cultivos polarizados de células Huh7 infectadas con HCVcc. Las gráficas muestran los resultados de tres experimentos. La significación estadística fue determinada mediante la prueba ANOVA.

### El adaptador de clatrina AP-2 no está involucrado en la exocitosis de HCVcc

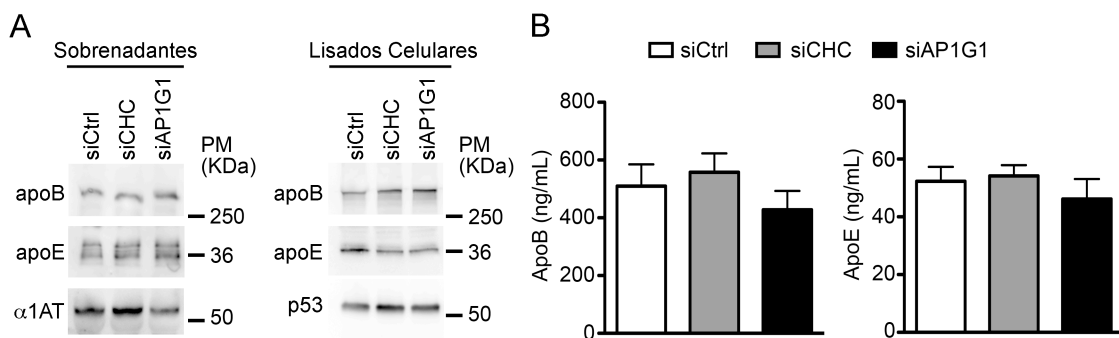
Los resultados anteriores sugieren que el transporte anterógrado mediado por clatrina participa en la secreción de HCVcc. Para comprobar si los efectos observados tras la inhibición de clatrina y dinamina podían estar relacionados con el bloqueo de procesos endocíticos, se repitieron los mismos experimentos de la **Figura 1** silenciando la subunidad media del adaptador de clatrina AP-2 (AP2M1). AP-2 es un complejo multiproteico que regula la endocitosis de proteínas de membrana, como el receptor de transferrina-1 (TfR1) (149) y es esencial para la endocitosis y formación de vesículas recubiertas de clatrina (26, 53, 182). Como control observamos por inmunofluorescencia cómo el silenciamiento de AP2M1 bloquea la internalización del TfR1 (**Figura 9A y B**). El silenciamiento de AP2M1 en células permanentemente infectadas con HCVcc no afectó la acumulación extracelular de RNA viral (**Figura 9C**), indicando que la salida viral no se ve comprometida por el silenciamiento de AP-2. Estos datos sugieren que la secreción de HCVcc depende de una ruta exocítica en la que participan clatrina, AP-1 y dynamina, pero no AP-2.



**Figura 9 – La exocitosis del HCVcc no está mediada por AP-2.** (A) Análisis por Western blot del silenciamiento de AP2M1 (siAP2M1). p53 se utilizó como control de carga. (B) Análisis por inmunofluorescencia de la localización del TfR1 (verde) tras el silenciamiento de AP2M1. Azul (DAPI): núcleos. Barras: 25  $\mu$ m. (C) Cuantificación por qPCR de los niveles de RNA viral extracelular en células Huh7 permanentemente infectadas con HCVcc y transfectadas con siRNA *Smartpool* frente a AP2M1. Los resultados corresponden a seis experimentos por triplicado y las diferencias no son estadísticamente significativas según el test Mann-Whitney.

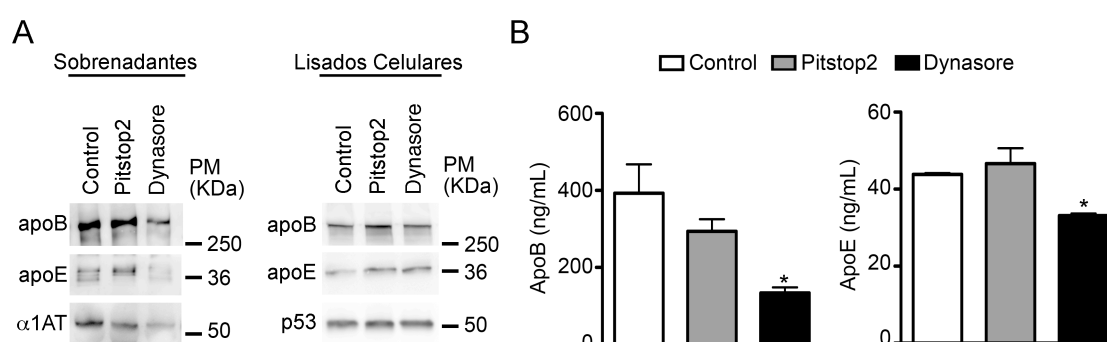
### Clatrina y AP-1 no son necesarias para la secreción de apoB y apoE

Numerosos estudios sostienen que la salida del HCV está íntimamente ligada a la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (10). En este sentido, hemos investigado si el bloqueo de la secreción del HCVcc observado en nuestros experimentos está causado por alteraciones en la secreción de componentes de las VLDL como apoE y apoB. Usando el mismo abordaje experimental, analizamos el efecto del silenciamiento y/o inhibición de clatrina y AP-1 sobre la secreción de apoB y apoE en células Huh7 infectadas por HCVcc. El análisis de los niveles de apoB y apoE en sobrenadantes y lisados celulares mediante Western blot (**Figura 10A**) y ELISA (**Figura 10B**) mostró que no hay cambios significativos en la secreción de estas apolipoproteínas entre las distintas condiciones experimentales.



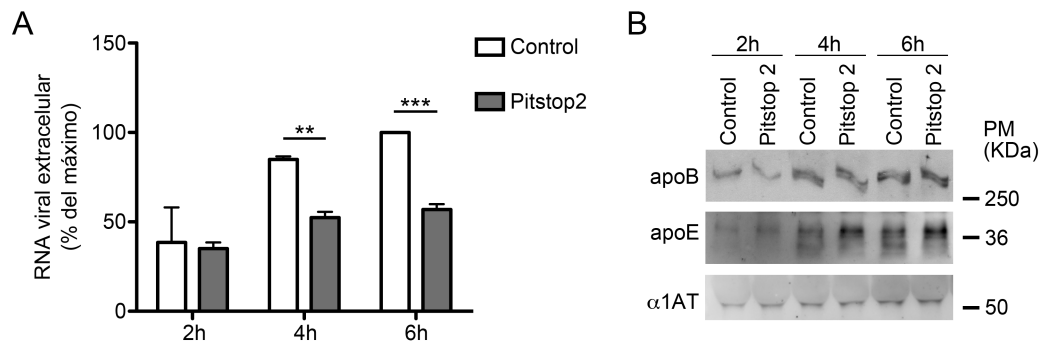
**Figura 10 – La secreción de apoB y apoE no se ve afectada por la interferencia de clatrina o AP-1.** Análisis por Western blot (A) y por ELISA (B) de los niveles de apoB y apoE secretados a partir de células Huh7 infectadas con HCVcc y transfectadas con siRNA *Smartpool* para CHC y AP1G1. En los Western blots, los controles de carga utilizados fueron alfa-1 anti-tripsina ( $\alpha$ 1AT) en los sobrenadantes y p53 en los lisados celulares. Las gráficas corresponden a dos experimentos por duplicado. Las diferencias no son estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de Mann-Whitney.

De manera similar, la inhibición de clatrina por pitstop2 (**Figura 11**) tampoco provocó cambios significativos en la secreción de las apolipoproteínas en células Huh7 infectadas. Sin embargo, la inhibición de dinamina por dynasore provocó una reducción significativa de la secreción de apoB, apoE y alfa-1 anti-tripsina ( $\alpha$ 1AT).  $\alpha$ 1AT es un indicador general de la secreción en hepatocitos humanos, por lo que estos datos sugieren que dinamina podría tener un papel más amplio en procesos exocíticos.



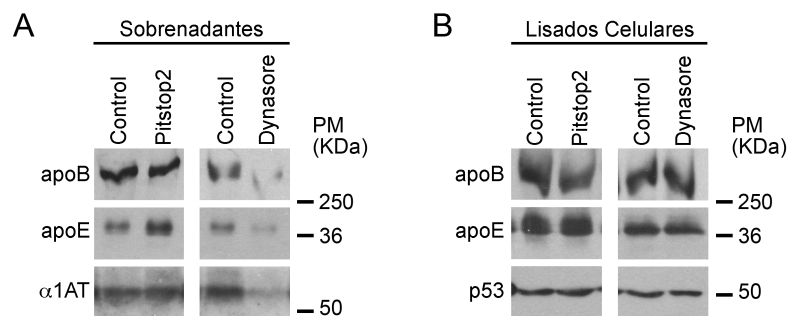
**Figura 11 - La secreción de apoB y apoE no está bloqueada por la inhibición de clatrina.** (A) Análisis por Western blot de los niveles de apoB y apoE en los sobrenadantes y lisados celulares de Huh7 infectadas con HCVcc y tratadas con pitstop2 y dynasore durante 6 horas.  $\alpha$ 1AT y p53 fueron usados como control de carga en los sobrenadantes y lisados celulares, respectivamente. (B) Determinación por ELISA de los niveles de apoB y apoE secretados. Los resultados corresponden a dos experimentos por duplicado. La significación estadística fue determinada mediante la prueba de Mann-Whitney.

Asimismo, se realizaron ensayos en células Huh7 infectadas por HCVcc tratadas con pitstop2 a distintos tiempos, analizando en paralelo tanto la secreción de apoB, apoE y  $\alpha$ 1AT como los niveles extracelulares de RNA viral. Los resultados muestran que la reducción de la secreción de RNA viral en células tratadas con pitstop2 (**Figura 12A**) no está acompañada de una disminución de la secreción de apoB, apoE y  $\alpha$ 1AT en ninguno de los tiempos estudiados (**Figura 12B**).



**Figura 12** – Análisis cinético de la secreción de RNA viral por qPCR (A) y de los niveles de apoB, apoE y  $\alpha$ 1AT por Western blot (B) en células Huh7 infectadas por HCVcc y tratadas con pitstop2. La gráfica presenta los porcentajes relativos al máximo valor (6h) de tres experimentos. La significación estadística se determinó mediante la prueba ANOVA.

Estos resultados fueron confirmados por Western-blot en cultivos altamente polarizados de Huh7 tratados con los inhibidores pitstop y dynasore (**Figura 13**).



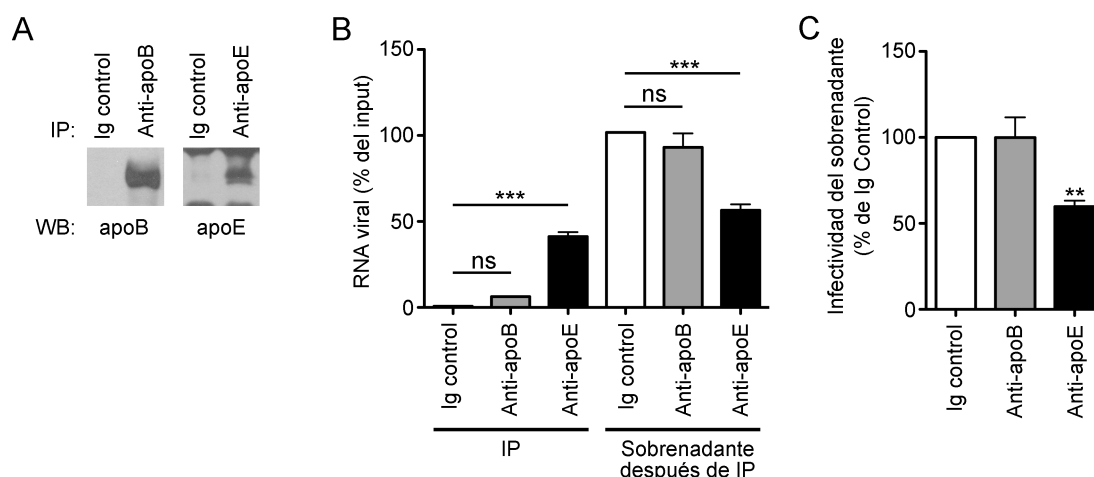
**Figura 13** – Análisis por Western blot de los niveles de apoB y apoE en sobrenadantes y lisados celulares de células Huh7 cultivadas en Matrigel, infectadas con HCVcc y tratadas con pitstop2 o dynasore.  $\alpha$ 1AT y p53 fueron usados como controles de carga en los sobrenadantes y lisados celulares, respectivamente.

En conjunto, estos datos confirman que la salida de HCVcc desde el interior de los hepatocitos es un proceso dependiente de clatrina, AP-1 y dinamina, mientras que la secreción de apolipoproteínas asociadas a las VLDL no depende ni de clatrina ni de AP-1, siendo mediada únicamente por dinamina. De esta forma podemos afirmar que la disminución de la secreción viral observada después de la interferencia de clatrina y AP-1 no es consecuencia directa del bloqueo de la ruta secretoria de apoB o apoE.

### Asociación intracelular de apoE con HCVcc

A pesar de que los resultados anteriores apuntan a que el HCV usa el tráfico anterógrado mediado por clatrina durante la secreción viral, no existen evidencias que

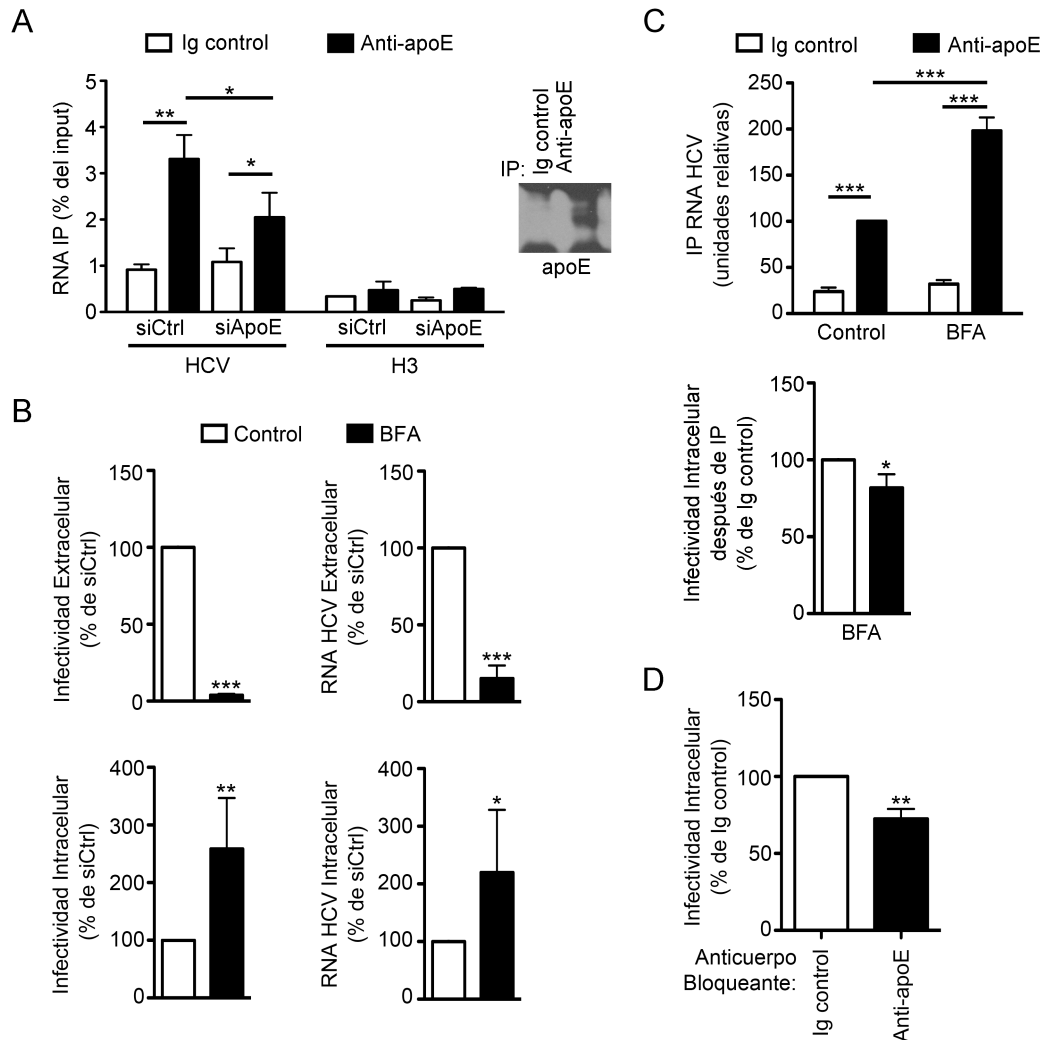
sugieran un papel de clatrina o AP-1 en la exocitosis de apoB y apoE. Sin embargo, a la vista de nuestros resultados, parece posible que la secreción de HCV pueda compartir algunos pasos tanto con la ruta de ensamblaje y maduración de las VLDL como con el tráfico vesicular mediado por clatrina. Para estudiar esta hipótesis, se analizó la composición lipoproteica de la partícula de HCVcc secretada al sobrenadante de células Huh7 permanentemente infectadas realizando experimentos de inmunoprecipitación de apoB y apoE. En la **Figura 14A**, se puede observar que ambos anticuerpos policlonales anti-apoE y anti-apoB inmunoprecipitan la proteína contra la que van dirigidos, pero sólo apoE, y no apoB, pudo ser detectada asociada a RNA viral (**Figura 14B**) y como parte de la partícula viral infectiva (**Figura 14C**), tal como se ha descrito anteriormente (87, 141).



**Figura 14 – Inmunoprecipitación de sobrenadantes de células Huh7 infectadas con HCVcc con anticuerpos control, anti-apoB y anti-apoE.** (A) Análisis por Western blot (WB) de los niveles de apoB y apoE inmunoprecipitados (IP). (B) Determinación de los niveles de RNA viral por qPCR en los inmunoprecipitados (IP) y sobrenadantes respectivos. Los resultados están presentados como porcentaje del *input* de RNA viral relativos a la condición Ig control del sobrenadante después de la IP y corresponden a tres experimentos. La significación estadística fue calculada mediante la prueba de Mann-Whitney. (C) Determinación de la infectividad de los sobrenadantes tras la inmunoprecipitación mediante titulación en células Huh7 *naïve* y qPCR. Los datos presentados son relativos a tres experimentos independientes. La significación estadística fue determinada mediante la prueba ANOVA.

A continuación, se estudió la especificidad de la asociación entre apoE y HCV, repitiendo los mismos experimentos de inmunoprecipitación con lisados celulares obtenidos por ciclos de congelación y descongelación para evitar la posible destrucción de la envuelta viral (154). Los resultados confirman que es posible coimmunoprecipitar el RNA viral utilizando el anticuerpo anti-apoE en lisados celulares (**Figura 15A**). Como control adicional confirmamos que el silenciamiento de apoE provocó una disminución significativa en los niveles de RNA viral inmunoprecipitado

con el anticuerpo anti-apoE. Además, se cuantificaron los niveles de histona H3 inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-apoE, siendo éstos similares a los valores de fondo del anticuerpo control, independientemente del silenciamiento, demostrando así que el RNA viral coinmunoprecipitó específicamente con apoE intracelular.

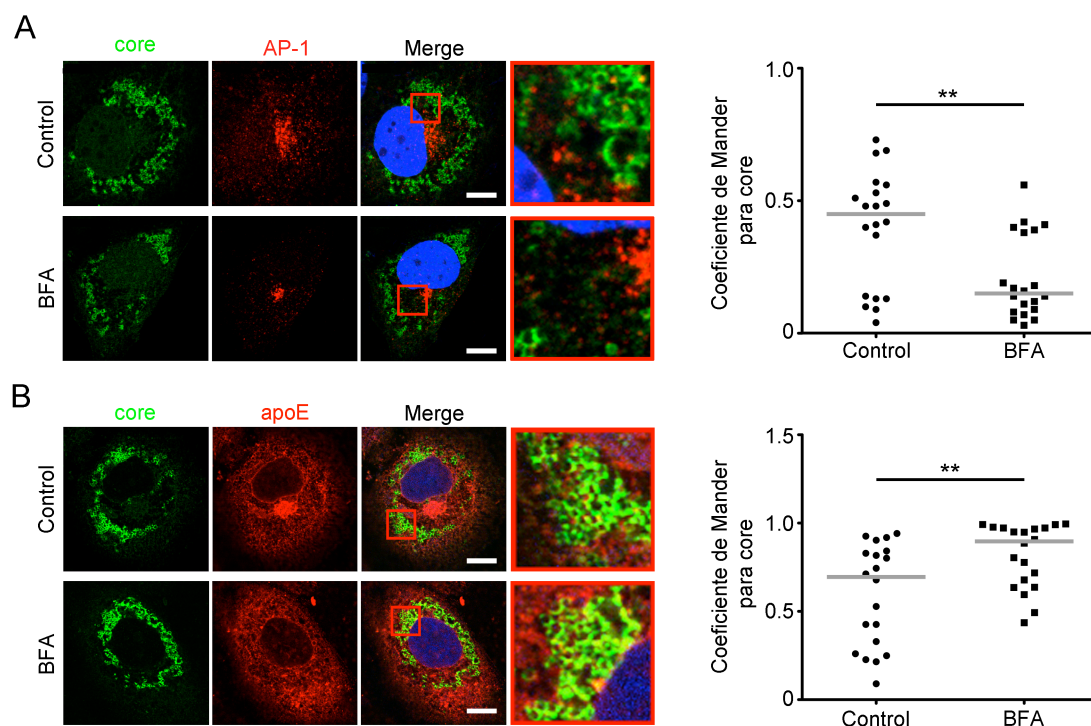


**Figura 15 – Asociación intracelular del HCVcc con apoE.** (A) Inmunoprecipitación de lisados de células Huh7 infectadas con HCVcc y transfectadas con los siRNA *Smartpool* control (siCtrl) y apoE (siApoE). Cuantificación por qPCR de los niveles de RNA de HCV y H3 inmunoprecipitados con los anticuerpos Ig control y anti-apoE. La significancia fue determinada por la prueba Mann-Whitney. (B) Determinación de los niveles de infectividad y RNA virales en células Huh7 infectadas con HCVcc y tratadas con 1  $\mu$ g/mL de brefeldina A (BFA). (C) Panel superior: Determinación por qPCR de los niveles de RNA viral inmunoprecipitados con los anticuerpos Ig control y anti-apoE en células Huh7 infectadas con HCVcc y tratadas con BFA. Los resultados están representados en relación a la condición Control inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-apoE. Panel inferior: Infectividad intracelular de células tratadas con BFA después de la inmunoprecipitación. (D) Infectividad intracelular de células infectadas con HCVcc y tratadas con BFA por titulación en células Huh7 *naïve* y en presencia de 5  $\mu$ g/mL de anticuerpo bloqueante Ig control y anti-apoE. La significación estadística fue determinada por la prueba ANOVA. Todos los resultados corresponden a tres experimentos.

Posteriormente, estudiamos la localización subcelular donde tiene lugar la asociación HCV/apoE, repitiendo los mismos experimentos en células tratadas con brefeldina A (BFA), un inhibidor del tráfico del RE hacia el Golgi (100). El tratamiento con BFA provocó una reducción drástica en los niveles de infectividad y RNA viral extracelulares, produciéndose a la vez su aumento en el interior celular (**Figura 15B**), tal y como previamente se ha descrito (65). Paralelamente, los ensayos de inmunoprecipitación de apoE en lisados de células tratadas con BFA mostraron una acumulación de RNA viral asociado a apoE intracelular (**Figura 15C panel superior**) y un descenso en la infectividad intracelular tras la inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-apoE (**Figura 15C panel inferior**). Estos datos sugieren que apoE se asocia con precursores infectivos del HCV en compartimentos relacionados con el RE, hipótesis corroborada por la neutralización parcial de viriones intracelulares con el anticuerpo bloqueante anti-apoE en células tratadas con BFA (**Figura 15D**) (159). En conjunto, estos resultados confirman que la interacción intracelular de apoE con el virus ocurre antes de salir del RE, argumento ya postulado por otros autores (10).

### Colocalización de la proteína viral *core* con AP-1 y apoE

Para estudiar si el tráfico vesicular mediado por clatrina participa antes o después de la salida del virus del RE en la ruta de secreción del HCV, se utilizaron células Huh7-Lunet-N electroporadas con RNA de JFH-1 y tratadas con BFA y se estudió la colocalización de *core* y AP-1 por inmunofluorescencia. Como el tratamiento con BFA induce una acumulación de proteínas en el RE que serían posteriormente secretadas, existen dos posibilidades en cuanto a la interacción *core*/AP-1: 1) que sea anterior a la salida del virus del RE, por lo que se observaría un aumento de la colocalización entre *core* y AP-1 en el RE; o 2) que tenga lugar tras el paso por el RE, de forma que el tratamiento con BFA impediría la salida del virión del RE, imposibilitando la colocalización. En la **Figura 16A** se puede observar cómo el tratamiento con BFA resulta en una disminución de la colocalización *core*/AP-1, dato que sugiere que la interacción del adaptador de clatrina AP-1 con la partícula viral comienza en un compartimento post-RE. Por otro lado, en la **Figura 16B**, se observa un aumento en la interacción *core*/apoE tras añadir BFA, confirmándose así que su asociación empieza antes de la salida del virus del RE.



**Figura 16 – Colocalización de core con AP-1 y apoE tras el tratamiento con BFA.** Análisis por inmunofluorescencia de células Huh7-Lunet-N productoras de HCVcc y tratadas con 1  $\mu$ g/mL de BFA. Verde: core. Rojo: AP-1 (A) o apoE (B). Azul (DAPI): núcleos. Barras: 10  $\mu$ m. Las imágenes muestran una única sección xy de una célula representativa analizada por microscopía confocal. Las gráficas de puntos muestran los coeficientes de Mander calculados para core en cada una de las 20 células analizadas de dos experimentos independientes. La significación estadística fue calculada mediante la prueba de Mann-Whitney.

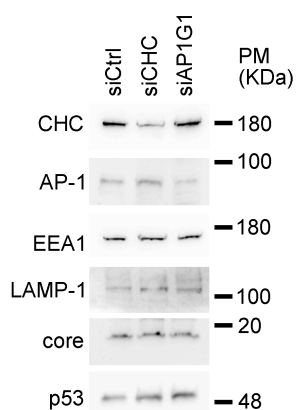
En conjunto, estos resultados demuestran que, durante la secreción del HCV, apoE y AP-1 interactúan con el virus antes y después de su salida del RE, respectivamente.

### Clatrina y AP-1 están implicadas en la localización de core en endosomas

Los datos anteriores indican que la interferencia del tráfico anterógrado dependiente de clatrina causa un bloqueo en el tráfico del HCVcc, posterior a su paso por el RE. Sin embargo, no observamos un incremento en la infectividad intracelular tras el silenciamiento de CHC o AP1G1 (**Figura 1, 2 y 6**). En este sentido, Gastaminza y colaboradores han descrito que algunas partículas inmaduras de HCVcc son degradadas activamente tras su paso por el RE, siendo los viriones maduros de baja densidad los únicos que consiguen escapar a esta degradación y ser secretados (65). Los mismos autores sostienen que si la ruta exocítica de las partículas víricas maduras es bloqueada, éstas podrían ser desviadas para su degradación, posiblemente por lisosomas, ya que la inhibición farmacológica de la actividad

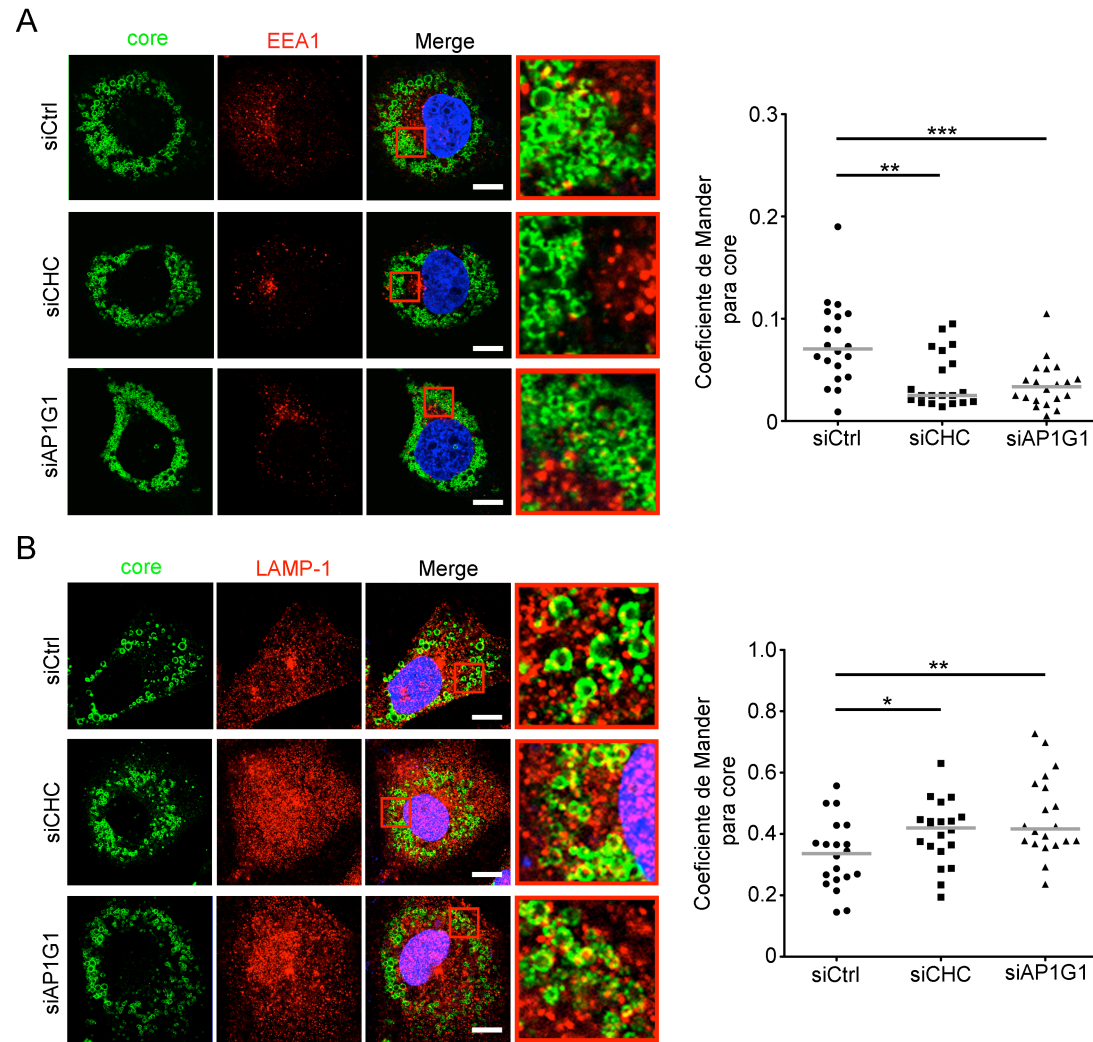


degradante de los lisosomas provoca la acumulación intracelular de partículas infectivas del HCVcc. Además, otros autores han observado que la inhibición del tráfico endosomal provoca la acumulación de *core* en endosomas tempranos, bloqueando la secreción viral, por lo que parece claro que antes de su salida de la célula, las partículas de HCV pasan por endosomas tempranos (104). Teniendo en cuenta estos datos, decidimos estudiar la colocalización de *core* con el marcador endosomal EEA1 (del inglés *Early Endosome Antigen 1*) y con la proteína lisosomal LAMP-1 (del inglés *Lysosomal-Associated Membrane Protein 1*) en células Huh7-Lunet-N electroporadas con RNA JFH-1 y transfectadas con los siRNA *Smartpool* específicos para CHC o AP1G1. Primero, comprobamos por Western blot que el silenciamiento de CHC y AP1G1 no altera la expresión de las proteínas *core*, EEA1 o LAMP1 analizadas (**Figura 17**).



**Figura 17** – Análisis por Western blot de la eficacia del silenciamiento de clatrina (siCHC) y AP-1 (siAP1G1) y de los niveles de expresión de *core*, EEA1 y LAMP-1. p53 fue utilizado como control de carga.

Posteriormente, se cuantificó los coeficientes de colocalización de Mander de la proteína viral *core* con la señal de EEA1 y LAMP-1. En la **Figura 18**, se demuestra que ambos silenciamientos inducen un descenso significativo de la colocalización *core*/EEA1 y un aumento de la colocalización *core*/LAMP1.



**Figura 18 – Colocalización de core con EEA1 y LAMP-1 en células Huh7-Lunet-N productoras de HCVcc y transfectadas con siRNA contra clatrina y AP-1.** Análisis por inmunofluorescencia de la colocalización core/EEA1 (A) y core/LAMP-1 (B). Verde: core. Rojo: EEA1 (A) o LAMP-1 (B). Azul (DAPI): núcleos. Barras: 10  $\mu$ m. Las imágenes muestran una única sección xy de una célula representativa analizada por microscopía confocal. Las gráficas de puntos muestran los coeficientes de Mander calculados para core en cada una de las 20 células analizadas en dos experimentos independientes. La significación estadística fue calculada mediante la prueba de Mann-Whitney.

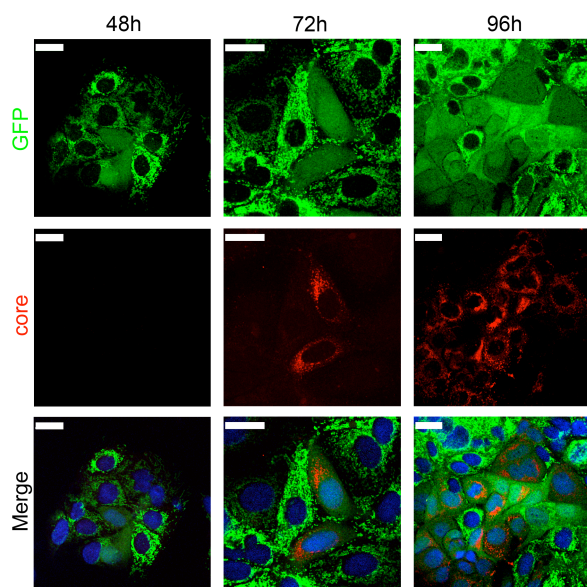
En conjunto, estos datos demuestran que clatrina y su adaptador AP-1 participan en el tráfico de la proteína viral core a través de compartimentos endosomales. La disminución de la expresión de clatrina o AP-1 provoca una acumulación de core en lisosomas, lo que sugiere que la ruta de secreción transendosomal del HCVcc está alterada y que parte de la progenie viral madura infectiva es degradada en lisosomas.

## Caracterización del papel de apoB y apoE en la transmisión célula a célula del HCVcc

El HCV es capaz de infectar los hepatocitos a través de transmisión célula a célula (30, 148, 203, 205), aunque los mecanismos concretos que regulan esta ruta no son totalmente conocidos. Teniendo en cuenta que el HCV es secretado en asociación con componentes de las VLDL (19, 65, 78, 82, 87), hemos estudiado el papel de las apolipoproteínas B y E en la transmisión célula a célula del HCVcc.

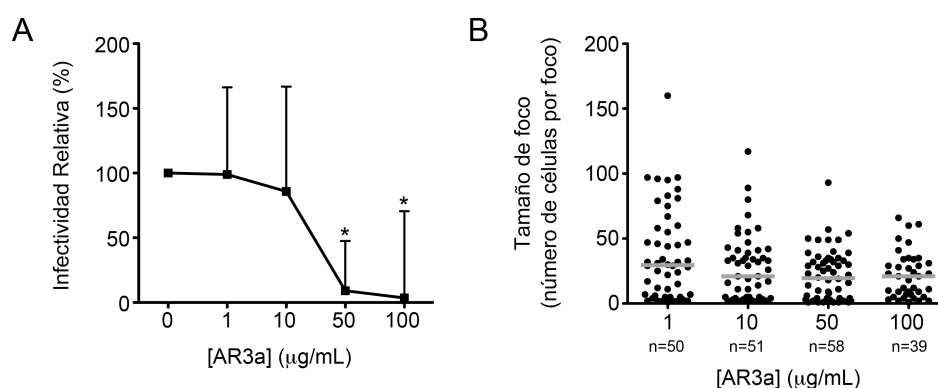
### Desarrollo de un sistema para estudiar la transmisión célula a célula del HCVcc *in vitro*

En primer lugar hemos desarrollado un sistema de monitorización de la transmisión célula a célula del HCVcc tomando como referencia la línea celular Huh7.5-GFP-MAVS. El sistema reportero GFP-MAVS permite la detección de eventos de infección en células individuales ya que la redistribución de la GFP-MAVS provocada por el HCVcc puede ser visualizada por microscopia (ver apartado *Líneas Celulares de Materiales y Métodos*). Para evaluar la especificidad de este sistema, realizamos inmunofluorescencias anti-core en células Huh7.5-GFP-MAVS infectadas con HCVcc. En la **Figura 19**, se muestra cómo todas las células infectadas son positivas para core (rojo) y presentan una redistribución de la fluorescencia asociada a MAVS (verde). Sin embargo, no todas las células con la señal citoplasmática verde son positivas para core, especialmente a tiempos cortos tras la infección, lo que sugiere que el sistema reportero GFP-MAVS mejora la sensibilidad en la detección de la infección por HCVcc.



**Figura 19 – Análisis por microscopia confocal de células Huh7.5-GFP-MAVS infectadas con HCVcc.** Inmunofluorescencia anti-core tras 48, 72 y 96 h de infección. Verde: GFP. Rojo: core. Azul (DAPI): núcleos. Barras: 25  $\mu$ m.

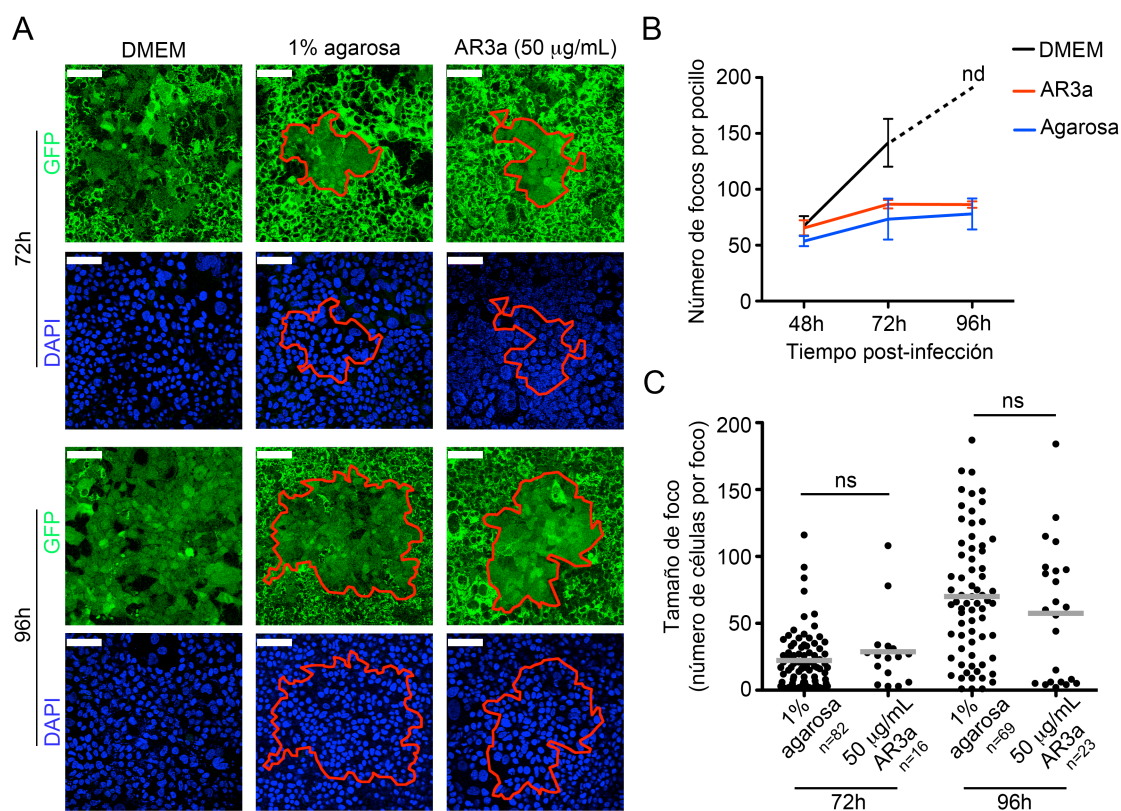
La infección extracelular (o *cell-free*) del HCVcc puede ser bloqueada *in vitro* por una capa de agarosa o de anticuerpos bloqueantes dirigidos contra la envuelta viral (34, 203). A continuación, analizamos el efecto de la adición de una capa de agarosa al 1% sobre células infectadas (8). Como control positivo, incubamos las células en presencia del anticuerpo monoclonal humano AR3a (105), que reconoce una región antigénica de la glicoproteína E2 bloqueando la interacción extracelular entre el HCV y su receptor CD81, siendo una herramienta perfecta para bloquear la infección *cell-free* (69). La concentración de AR3a necesaria para bloquear la infección de HCVcc en nuestro sistema fue determinada por titulación del anticuerpo. La concentración mínima que logró inhibir la infección *cell-free*, sin afectar el paso célula a célula del HCVcc, fue 50  $\mu\text{g/mL}$  (**Figura 20**).



**Figura 20 – Titulación del anticuerpo bloqueante AR3a.** Las células Huh7.5-GFP-MAVS fueron infectadas con HCVcc e incubadas con concentraciones distintas de AR3a hasta 72 h postinfección (p.i.). (A) Porcentaje de infectividad respecto a la condición control (sin anticuerpo). La infectividad fue calculada a partir del número de FFU por pocillo observados por inmunocitoquímica anti-*core*. Los resultados corresponden a dos experimentos independientes. La significación estadística fue determinada mediante la prueba ANOVA. (B) Número de células por foco de infección en presencia de concentraciones crecientes de AR3a a 72 h p.i.. En la gráfica cada punto corresponde al número de células de un foco y representa dos experimentos independientes. Las diferencias no son significativas según la prueba de Mann-Whitney.

Para evaluar la transmisión célula a célula del HCV, infectamos las células con una MOI baja (0,001) favoreciendo así la formación de focos pequeños e individualizados. Pasadas 24 h, el medio fue sustituido por DMEM, DMEM con agarosa al 1% o con 50  $\mu\text{g/mL}$  de AR3a y se dejó progresar la infección hasta las 96 h. En las células incubadas con DMEM se observó una infección generalizada con focos irregulares e indefinidos y la ausencia de focos individualizados (**Figura 21A: izquierda**). En contraste, en las células cultivadas con agarosa (**centro**) y AR3a (**derecha**) se formaron focos de infección redondeados y compactos, rodeados de células no

infectadas, indicando que en ambas condiciones la infección *cell-free* del HCVcc está bloqueada.



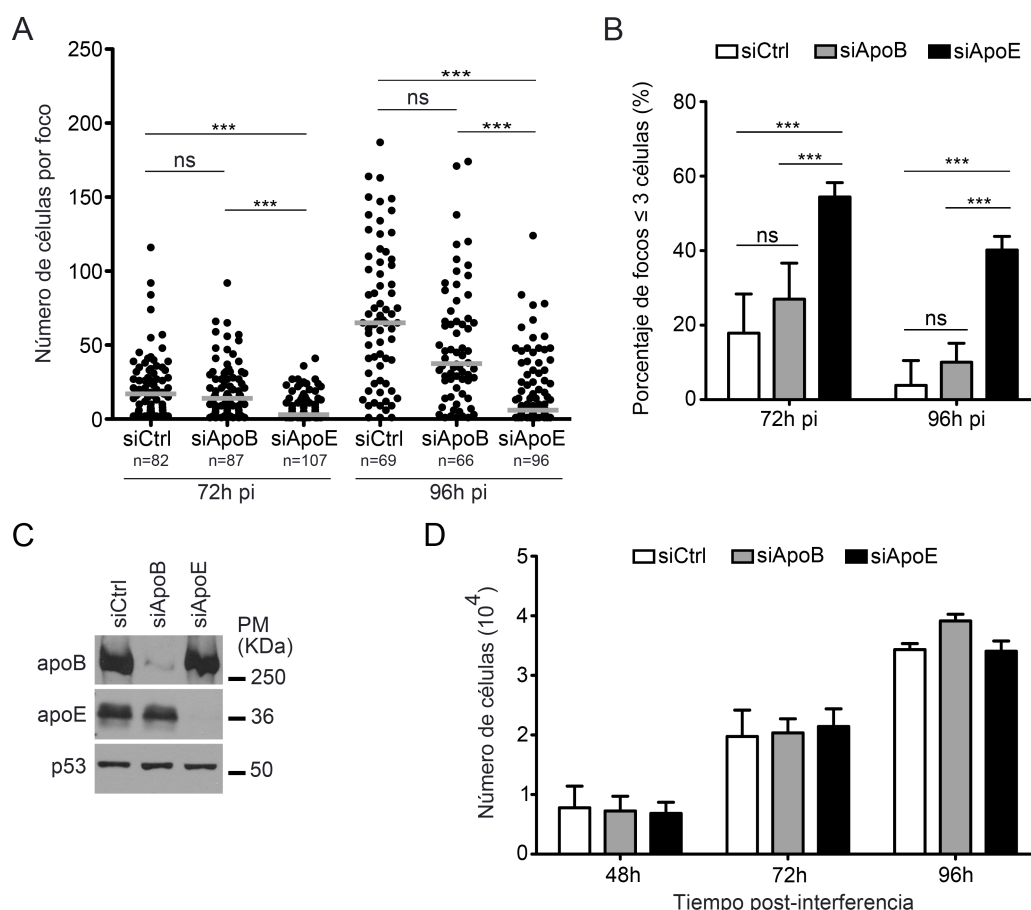
**Figura 21 – Ensayo de transmisión célula a célula del HCVcc.** (A) Análisis por microscopía confocal de células Huh7.5-GFP-MAVS infectadas con HCVcc, incubadas con DMEM, 1% de agarosa o 50 µg/mL de AR3a en DMEM y fijadas a 72 y 96 h p.i.. Las líneas rojas señalan los perímetros de los focos. Azul (DAPI): núcleos. Barras: 75 µm. (B) Evolución temporal de la infección por HCVcc en células Huh7.5-GFP-MAVS incubadas con DMEM (negro), 1% de agarosa (azul) o 50 µg/mL de AR3a en DMEM (rojo). La gráfica representa un experimento por triplicado. El número de focos a 96 h p.i. en la condición DMEM fue imposible de determinar (nd: no determinado) debido a la infección generalizada en todos los triplicados. (C) Comparación del tamaño de foco entre las condiciones de agarosa y AR3a a 72 y 96 h p.i.. Los resultados corresponden a tres experimentos independientes por duplicado. La significación estadística fue determinada por el test de Kruskal-Wallis.

Para descartar eventos secundarios de infección *cell-free* también se cuantificó el número de focos en las distintas condiciones experimentales (**Figura 21B**). En las células control con DMEM se observó un aumento del número de focos a lo largo del tiempo, coincidente con infecciones secundarias de virus secretados al sobrenadante por células infectadas con el inóculo inicial. El número de focos en células cultivadas con agarosa o AR3a no se incrementó con el tiempo, sugiriendo que en estas condiciones no tienen lugar sucesivas rondas de infección posteriores al inóculo inicial. Además, comparando el tamaño de foco entre ambas condiciones no se observan

diferencias significativas (**Figura 21C**). Estos resultados indican que la agarosa bloquea eficazmente la infección *cell-free* del HCVcc y que su efecto es comparable al de anticuerpos bloqueantes dirigidos contra la envuelta del HCV, tal como se ha publicado anteriormente (203). En resumen, la utilización de la línea celular Huh7.5-GFP-MAVS junto con la agarosa o el anticuerpo AR3a son una aproximación experimental adecuada para el estudio de la infección célula a célula del HCVcc.

### **Papel de apoB y apoE en la transmisión célula a célula del HCV**

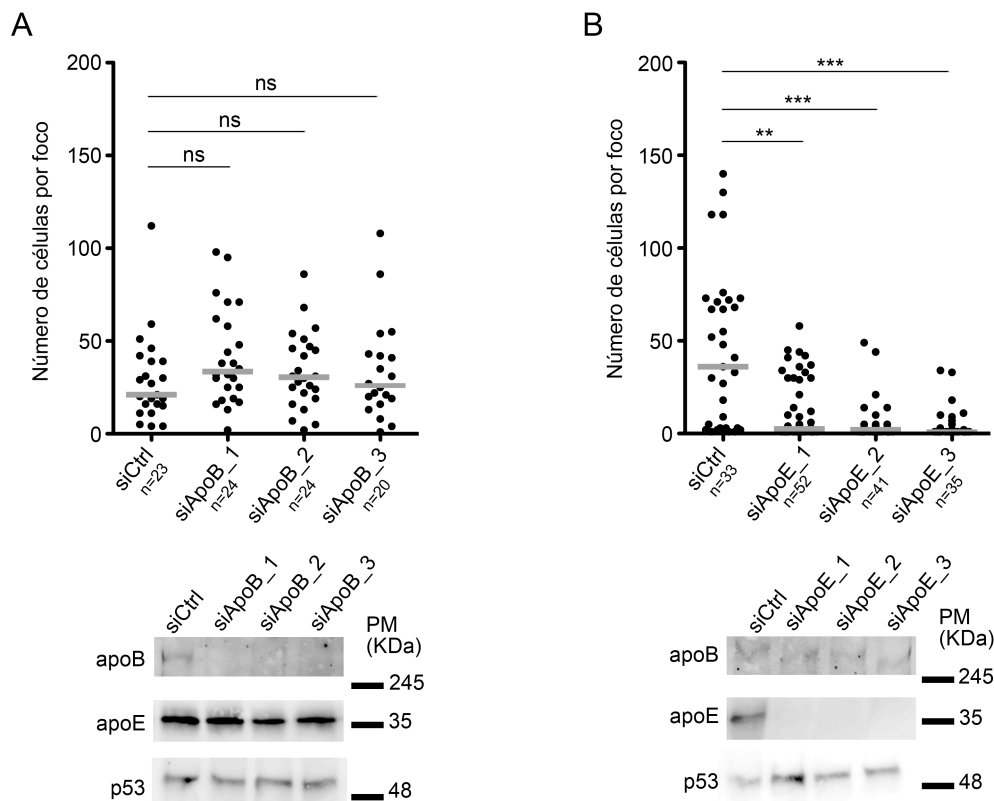
Para estudiar el papel de las apolipoproteínas apoB y apoE en la infección célula a célula del HCV realizamos ensayos con agarosa sobre células Huh7.5-GPS-MAVS infectadas con HCVcc a baja MOI y transfectadas con los siRNA *Smartpool* específicos para apoB y apoE. A 72h y 96 h p.i. cuantificamos el tamaño de los focos para evaluar la progresión de la infección. En la **Figura 22A** podemos observar cómo el silenciamiento de apoE disminuyó significativamente ( $p < 0,001$ ) el tamaño de foco respecto al control en los tiempos analizados. Sin embargo, el silenciamiento de apoB no causó ningún efecto significativo. Como se esperaba, en las células control el tamaño de foco aumentó con el tiempo, indicando la existencia de una infección productiva por transmisión célula a célula del HCVcc. Paralelamente, se cuantificó el número de focos de pequeño tamaño, de hasta 3 células (**Figura 22B**), y se observó que éstos se encontraban en un número significativamente mayor en las células con apoE silenciado (54% a 72 h p.i. y 40% a 96 h p.i.) en comparación con las células control (18% y 4%, respectivamente) y las células con apoB silenciado (27% y 10%, respectivamente). El análisis por Western blot de los silenciamientos (**Figura 22C**) reveló que ambos *Smartpools* de siRNA tienen una eficiencia cercana al 100%, por lo que la ausencia de efecto en la transmisión célula a célula del HCVcc en células con silenciamiento de apoB no podría explicarse por un silenciamiento poco eficiente de esta proteína. También descartamos que la disminución de tamaño de foco en las células con silenciamiento de apoE fuese debido a una disminución de la tasa de división celular (**Figura 22D**).



**Figura 22 – Efecto del silenciamiento de apoB y apoE en la transmisión célula a célula del HCVcc.** (A) Cuantificación del número de células por foco a 72 y 96 h p.i.. La significación fue determinada mediante el test de Kruskal-Wallis. (B) Porcentaje de focos pequeños ( $\leq 3$  células) en la transmisión célula a célula del HCVcc en células control y con silenciamiento de apoB o apoE. La significación fue determinada mediante la prueba ANOVA. (C) Western blot de la eficacia del silenciamiento de apoB y apoE. p53 se utilizó como control de carga. (D) Ensayo de proliferación celular en Huh7.5-GFP-MAVS con silenciamiento de apoB y apoE. Todos los resultados corresponden a tres experimentos independientes por triplicado.

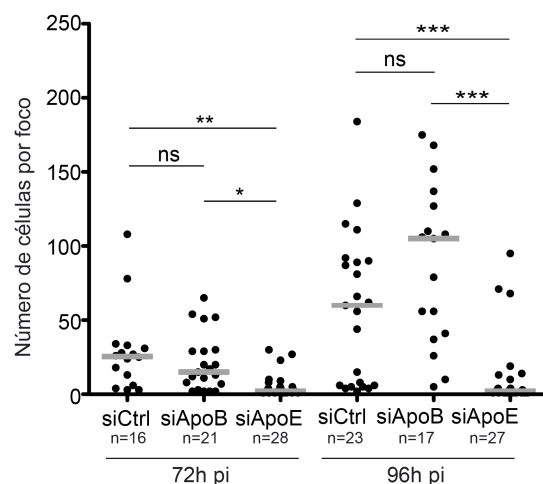
Por otro lado, obtuvimos resultados similares en ensayos con agarosa usando tres siRNA individuales *Set-of-4* para apoB y apoE (**Figura 23A y B**), descartando algún posible efecto *off-target* de los siRNA *Smartpool*.





**Figura 23 – Transmisión célula a célula del HCVcc usando siRNA individuales para apoB (A) y apoE (B).** Paneles superiores: Las gráficas muestran el tamaño de los focos a 96 h p.i. de dos experimentos independientes. La significación estadística fue determinada mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Paneles inferiores: los Western blots muestran la eficacia del silenciamiento de apoB y apoE. p53 fue usado como control de carga.

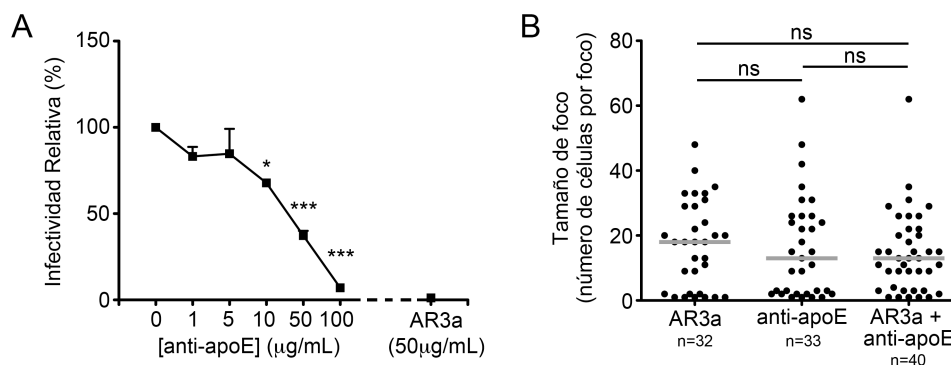
Para confirmar los resultados anteriores se repitieron los ensayos de transmisión célula a célula utilizando el anticuerpo bloqueante AR3a. Igualmente, el silenciamiento de apoE, pero no el de apoB, disminuyó significativamente el tamaño de foco en los dos tiempos analizados (**Figura 24**).



**Figura 24 – Transmisión célula a célula del HCVcc usando el anticuerpo bloqueante AR3a en células Huh7.5-GFP-MAVS transfectadas con los siRNA *Smartpool* específicos para apoB y apoE.** La gráfica muestra el número de células por foco a 72 y 96 h p.i. de dos experimentos independientes por duplicado. La significación estadística fue determinada mediante la prueba de Kruskal-Wallis.



Estudios previos han demostrado que la transmisión célula a célula del HCVcc es resistente a la neutralización por anticuerpos frente a los correceptores virales o a las proteínas de la envuelta viral (30, 203, 218). En este sentido, comprobamos que la incubación de células infectadas con un anticuerpo anti-apoE, capaz de bloquear la infección *cell-free* (**Figura 25A**), no afecta a la transmisión célula a célula del HCV (**Figura 25B**).



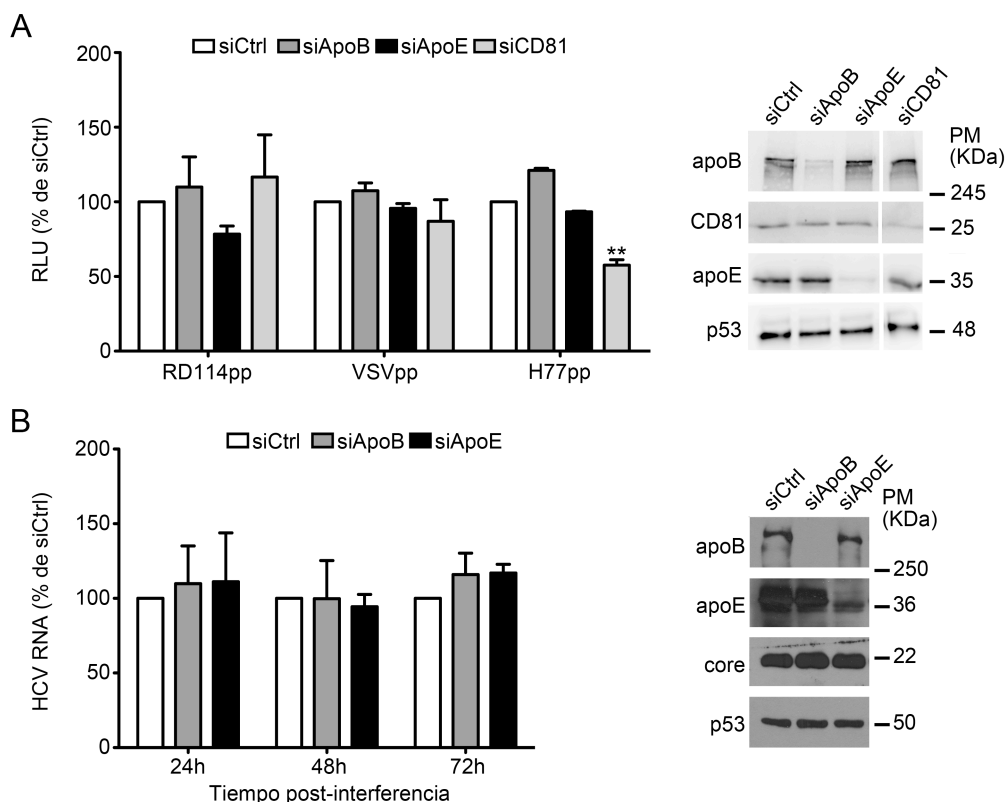
**Figura 25** – (A) Las células Huh7.5-GFP-MAVS fueron infectadas con HCVcc e incubadas con concentraciones crecientes de anticuerpo anti-apoE hasta 72 h p.i.. Como control, utilizamos el anticuerpo AR3a. La infectividad fue calculada a partir del número de FFU por pocillo observadas por inmunocitoquímica anti-core. En la gráfica se representa el porcentaje de infectividad respecto a la condición control (sin anticuerpo) de dos experimentos independientes. La significancia fue determinada mediante la prueba de ANOVA. (B) Número de células por foco de infección en presencia de los anticuerpos AR3a (50 μg/mL), anti-apoE (100 μg/mL) o una combinación de ambos a 72 h p.i.. En la gráfica cada punto corresponde al número de células por foco de dos experimentos independientes por duplicado. La significación fue determinada mediante la prueba de Kruskal-Wallis.

En conjunto, estos datos indican que apoE es crucial para la transmisión célula a célula del HCVcc, mientras que la implicación de apoB es altamente improbable.

### El silenciamiento de apoB o apoE no afecta a la entrada ni la replicación del HCV

A continuación, evaluamos si los datos obtenidos en los ensayos de transmisión célula a célula podrían ser resultado de algún efecto sobre la entrada y/o replicación del HCV. Para ello realizamos ensayos de infección con partículas retrovirales pseudotipadas en los que observamos que los silenciamientos de apoB y apoE no causan ningún efecto sobre la entrada de las HCVpp (**Figura 26A**). Como control de entrada viral, comprobamos que el silenciamiento de CD81 reduce la entrada de las

HCVpp. Además, como control de especificidad viral observamos que la entrada de las pseudopartículas VSVpp y RD114pp no se vio afectada en células transfectadas con los siRNA específicos para apoE o apoB. Estos datos indican que la expresión de apoB y apoE en las células diana no es imprescindible para la entrada del HCV.



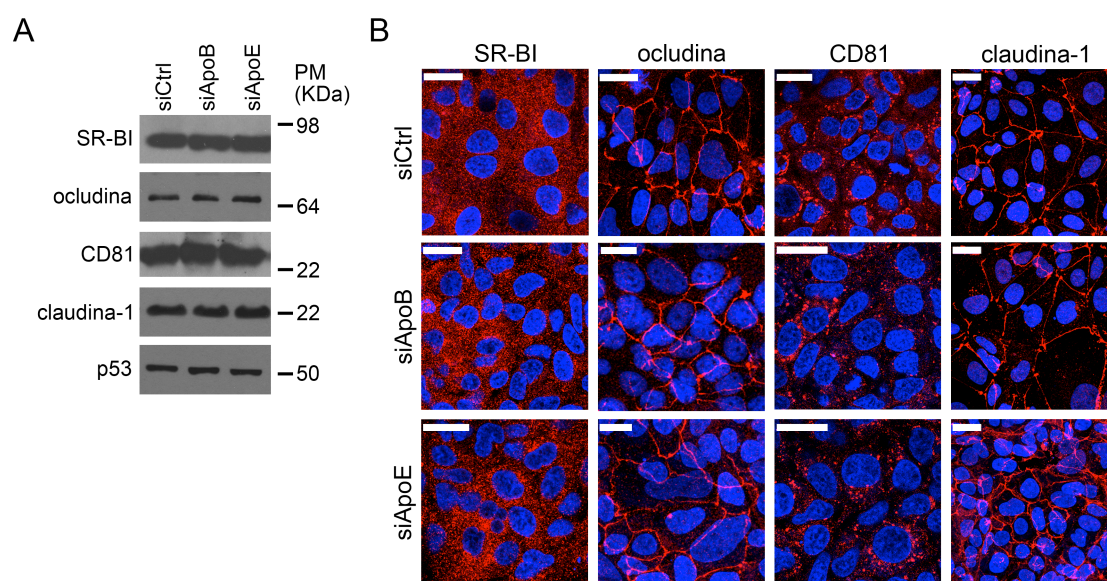
**Figura 26 – La entrada y replicación del HCV no se ven afectadas tras el silenciamiento de apoB y apoE.** (A) Ensayo con pseudopartículas en células Huh7 transfectadas con siRNA *Smartpool* control y específicos para apoB y apoE. El silenciamiento de CD81 fue usado como control positivo. Los resultados corresponden al porcentaje de unidades relativas de luminescencia (RLU) de dos experimentos independientes por triplicado. Los Western blots muestran la eficacia de los silenciamientos. p53 se utilizó como control de carga. (B) Cuantificación por qPCR de los niveles de RNA intracelular del HCV en células Huh7-Con1 transfectadas con los mismos siRNA. Los resultados corresponden a dos experimentos por triplicado. Los Western blots muestran la eficiencia de los silenciamientos y los niveles de acumulación de *core* intracelular en las células Huh7-Con1 a 72 h tras la interferencia. p53 fue utilizado como control de carga. La significación estadística fue determinada mediante la prueba de ANOVA.

Para caracterizar el papel de las apolipoproteínas en la replicación del HCV se utilizaron células Huh7-Con1 que expresan el replicón genómico del HCV 1b (120). Los resultados no evidenciaron cambios ni en los niveles de RNA viral intracelular ni en la acumulación intracelular de *core* tras la transfección de los siRNA (**Figura 26B**). Estos resultados concuerdan con anteriores estudios (19, 65, 78), corroborando que

las apolipoproteínas B y E no participan en la replicación del HCV, e indican que la disminución observada en la infección célula a célula tras el silenciamiento de apoE no se debe a una reducción en la replicación o traducción del HCV.

### El silenciamiento de apoB o apoE no afecta a la expresión ni la localización de los correceptores virales

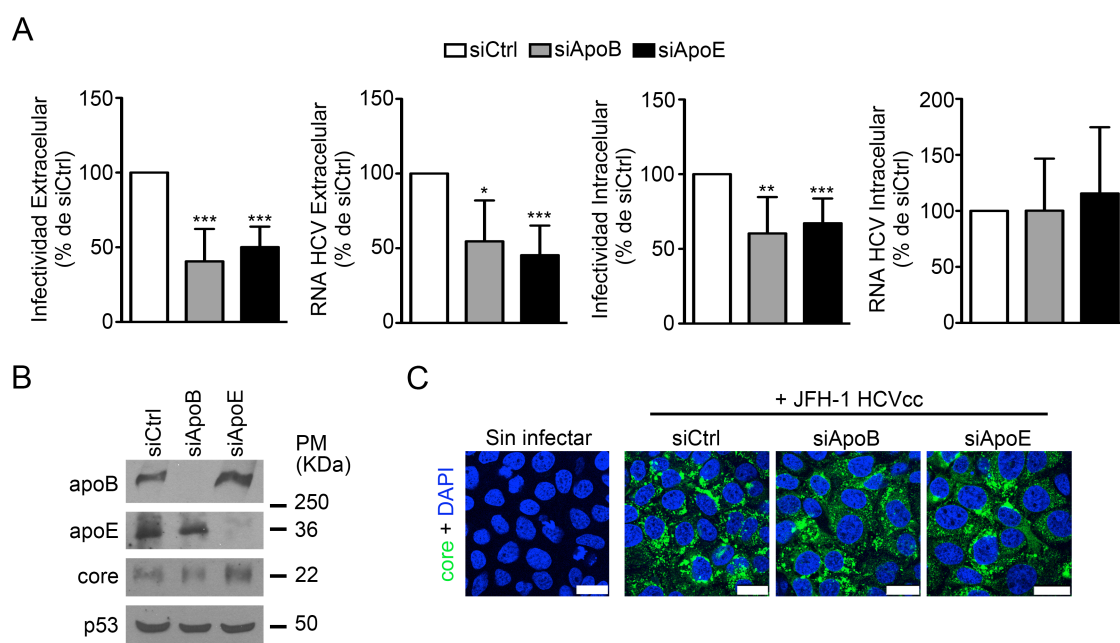
Varios estudios han demostrado que tanto la expresión como la localización de los correceptores virales son fundamentales para una infección productiva del HCV (172). Para estudiar el papel de apoB y apoE en estos procesos se determinó la expresión y la localización de los cuatro receptores canónicos del HCV en nuestro sistema de transmisión célula a célula. En la **Figura 27** se puede observar como la expresión y la localización de los receptores SR-BI, ocludina, CD81 y claudina-1 no se ve afectada por los silenciamientos de apoB o apoE.



**Figura 27 – La expresión de los correceptores del HCV SR-BI, ocludina, CD81 y claudina-1 no se ve afectada por la interferencia de apoB o apoE.** (A) Análisis por Western blot de la expresión de los correceptores del HCV en células Huh7.5-GFP-MAVS infectadas con HCVcc por transmisión célula a célula tras el silenciamiento de apoB y apoE. p53 se utilizó como control de carga. (B) Determinación por inmunofluorescencia indirecta de la localización celular de los correceptores del HCV (rojo) en las mismas células. Azul (DAPI): núcleos. Barras: 25  $\mu$ m.

## ApoB participa en el ensamblaje de viriones infectivos por difusión *cell-free*

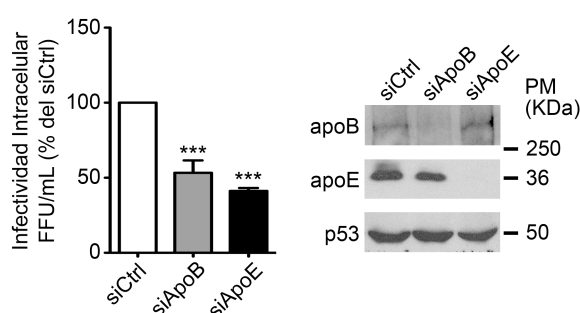
Estudios anteriores demostraron que apoE está implicada en el ensamblaje de HCV (19, 39, 75). Sin embargo, el papel de apoB es controvertido (65, 82, 87). Para abordar esta cuestión, analizamos si el silenciamiento de apoE y apoB en células permanentemente infectadas con HCVcc afecta a la secreción y ensamblaje virales (**Figura 28A**). La infectividad tanto extra como intracelular se vieron significativamente reducidas tras el silenciamiento de apoE y apoB. Sin embargo, no se observó una reducción ni en los niveles de RNA viral intracelular ni en la acumulación de la proteína viral *core* (**Figura 28B y C**), indicando que ambas apolipoproteínas participan en la morfogénesis y secreción del HCVcc.



**Figura 28 – Papel de apoB y apoE en el ensamblaje y salida del HCVcc.** (A) Cuantificación por qPCR de los niveles de RNA e infectividad virales en células Huh7 permanentemente infectadas con HCVcc y transfectadas con siRNA *Smartpool* para apoB (siApoB), apoE (siApoE) y control (siCtrl). Los resultados presentados corresponden a tres experimentos por triplicado. La significación estadística fue determinada mediante la prueba ANOVA. (B) Western blot de la eficacia de los silenciamientos y de la acumulación intracelular de *core*. p53 fue usado como control de carga. (C) Análisis por inmunofluorescencia de *core* (verde) en células Huh7 con silenciamiento en apoB o apoE. Azul (DAPI): núcleos. Barras: 25  $\mu$ m.

A continuación se estudió el papel de apoE y apoB en el ensamblaje viral del HCVcc en el contexto de una infección célula a célula. Para ello se aislaron partículas virales intracelulares producidas por células recubiertas de agarosa y se analizó su infectividad por titulación en células Huh7.5 *naïve*. Sorprendentemente, en estas

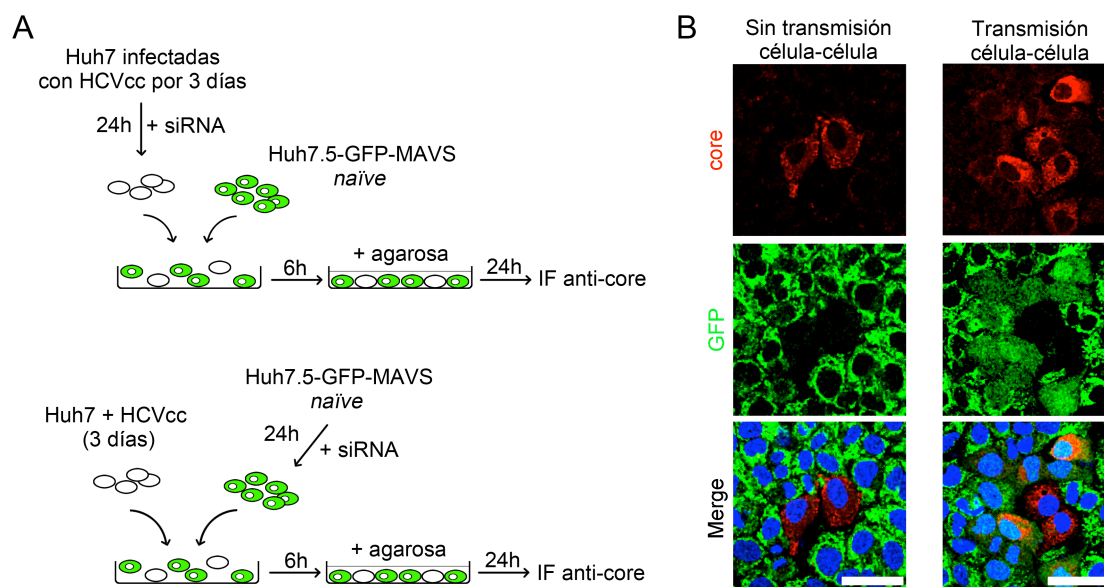
condiciones, el silenciamiento de apoB, a pesar de no afectar la transmisión célula a célula (**Figura 22A, 23A y 24**), redujo significativamente la infectividad de los virus producidos en el contexto de infección célula a célula (**Figura 29**). Por otra parte, el silenciamiento de apoE disminuyó tanto la transmisión del HCV por transferencia célula a célula (**Figura 22A, 23B y 24**) como la infectividad de virus producidos en ambos tipos de infección (**Figura 28A y 29**). Estos resultados sugieren que apoB participa en el ensamblaje de partículas víricas que son infectivas en un contexto de infección *cell-free* mientras que no es necesaria para la infección célula a célula del HCV.



**Figura 29 – Infectividad de partículas intracelulares producidas por infección célula a célula.** Determinación por inmunocitoquímica de la infectividad intracelular de células Huh7.5-GFP-MAVS. La gráfica representa el porcentaje de FFU/mL de tres experimentos por triplicado. La significancia fue determinada mediante ANOVA. Los Western blots muestran la eficiencia del silenciamiento de apoB y apoE. p53 se utilizó como control de carga.

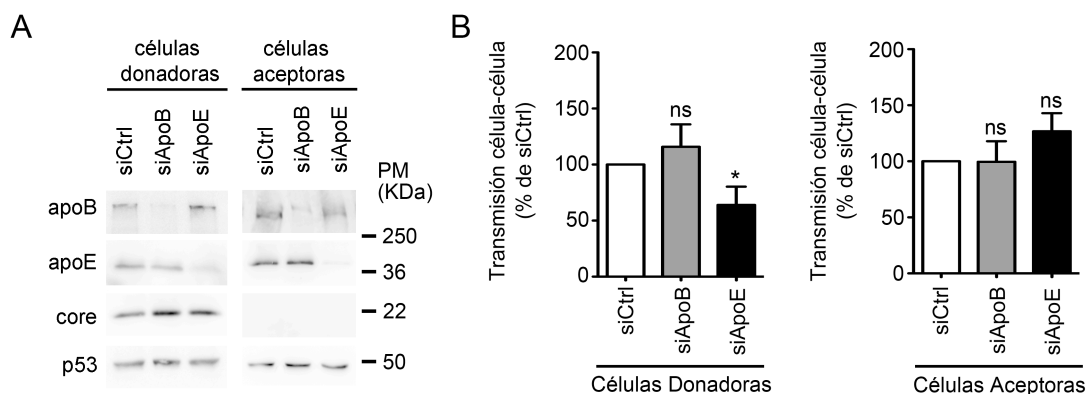
### La expresión de apoE en células productoras es determinante en la transmisión célula a célula del HCV

Para caracterizar con mayor profundidad el papel de apoE en la transmisión célula a célula del HCV, realizamos ensayos de infección célula a célula en cocultivos en los que la expresión de apoB o apoE está silenciada selectivamente en células donadoras o aceptoras. Como donadoras utilizamos células Huh7 infectadas con HCVcc y como aceptoras células Huh7.5-GFP-MAVS no infectadas. En este sistema, las células donadoras son siempre positivas para *core* y no expresan GFP, mientras que las aceptoras pueden ser identificadas a través de la expresión de GFP, que pasará a ser citoplasmática tras la infección por HCVcc permitiendo así estimar el número de eventos de transmisión célula a célula (**Figura 30**).



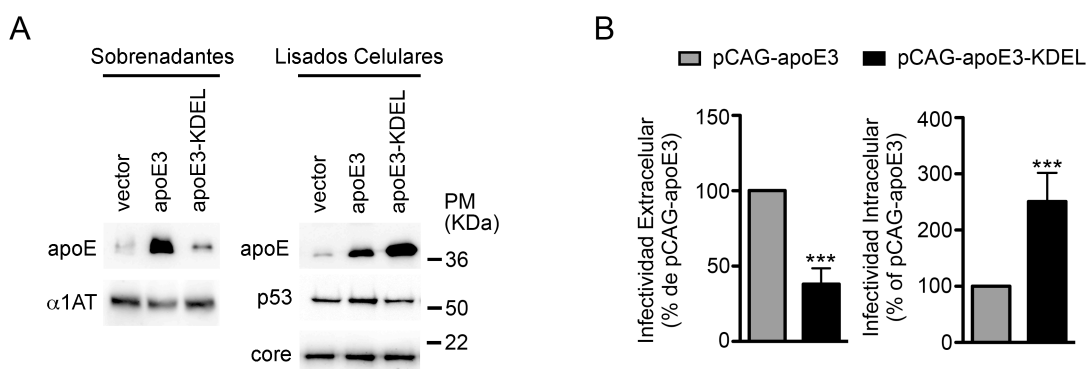
**Figura 30 – Ensayo de cocultivo celular.** (A) Esquema del ensayo de cocultivo usando las células Huh7 infectadas con HCVcc como donadoras y las células Huh7.5-GFP-MAVS sin infectar como aceptoras. (B) Análisis por microscopía confocal de la inmunofluorescencia anti-*core* (rojo) de células cocultivadas como en (A). Imágenes representativas de la ausencia de infección célula a célula (izquierda) determinada por la presencia de la señal mitocondrial verde, correspondiente a la localización natural de GFP-MAVS, en células aceptoras situadas junto a células productoras positivas para *core* (rojo); y de la presencia de paso célula a célula (derecha) determinada por la visualización de la traslocación de la señal GFP al citoplasma de las células aceptoras situadas alrededor de células donadoras positivas para *core*. Azul (DAPI): núcleos. Barras: 50  $\mu$ m.

Los resultados de la **Figura 31** muestran que el silenciamiento de apoB tanto en las células donadoras como en las aceptoras no afecta a la diseminación viral. Sin embargo, el silenciamiento de apoE en las células donadoras, pero no en las aceptoras, redujo significativamente la transmisión célula a célula del HCV. En resumen, estos resultados demuestran que en las células aceptoras los niveles de expresión de apoB y apoE no afectan a la entrada de virus *cell-free* (**Figura 26**) ni la infección célula a célula (**Figura 31**). Sin embargo, la expresión de apoE en células donadoras pero no la de apoB es determinante para la transmisión célula a célula del HCVcc.



**Figura 31 – Papel de apoB y apoE en células donadoras y aceptoras durante la transmisión célula a célula del HCVcc.** (A) Análisis por Western blot del silenciamiento de apoB y apoE y de los niveles de core en las células donadoras Huh7 y células aceptoras Huh7.5-GFP-MAVS. p53 se utilizó como control de carga. (B) Porcentaje de eventos de transmisión célula a célula del HCVcc en cocultivos usando células donadoras (izquierda) o aceptoras (derecha) con silenciamiento de apoB o apoE. Los eventos de transmisión célula a célula se cuantificaron por el ratio entre el número de focos con expresión citoplasmática de la GFP y el número total de focos positivos para core. Los resultados corresponden a cuatro experimentos independientes. La significación fue determinada mediante la prueba ANOVA.

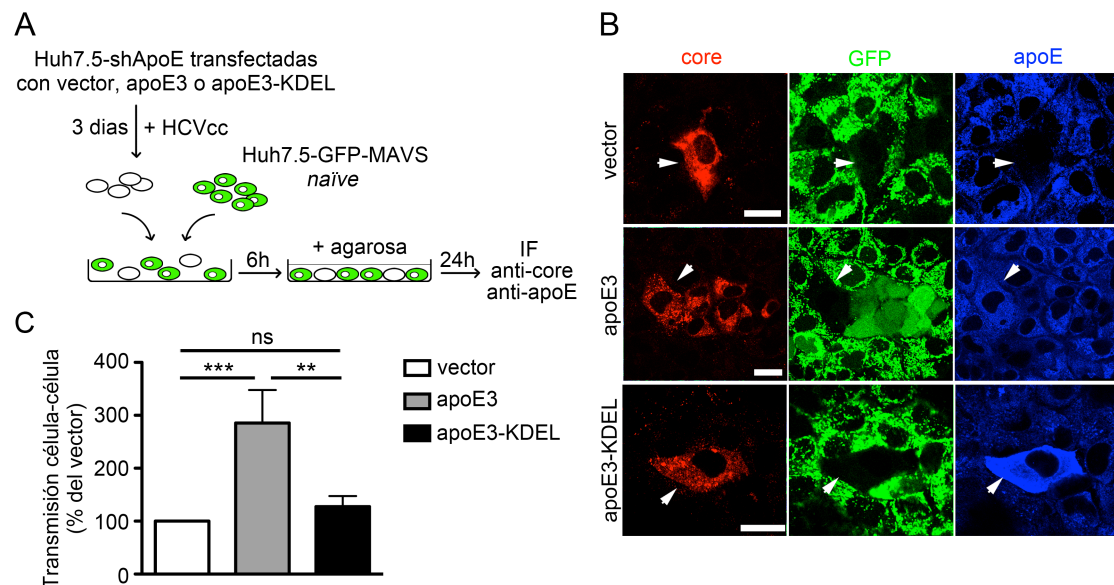
A continuación nos propusimos confirmar si apoE está presente en la partícula que infecta vía transmisión célula a célula. Para ello, llevamos a cabo una serie de experimentos en células Huh7.5 con apoE silenciada establemente, transfecando la forma *wildtype* de apoE3 o una variante que se queda retenida en el RE (apoE3-KDEL). En consonancia con un estudio anterior (75), en las células transfectadas con apoE3-KDEL se observó una acumulación intracelular y la consiguiente disminución de los niveles extracelulares, tanto de apoE como de partículas infecciosas de HCVcc (Figura 32).



**Figura 32 – Las células Huh7.5-shApoE fueron transfectadas con los plásmidos pCAG (vector vacío), pCAG-apoE3 (apoE3) o pCAG-apoE3-KDEL (apoE3-KDEL) y posteriormente inoculadas con HCVcc.** (A) Western blot de apoE, α1AT, p53 y core en los sobrenadantes y lisados celulares. (B) Las infectividades extra e intracelulares fueron determinadas 48 h p.i. por inmunocitoquímica anti-core. Las gráficas muestran el porcentaje de FFU/mL respecto a las células transfectadas con apoE3 de dos experimentos realizados por triplicado. La significación estadística se determinó mediante la prueba ANOVA.



A continuación, se realizaron ensayos de transmisión célula a célula utilizando estas células como donadoras (**Figura 33A**). Observamos que, en contraste con la expresión de apoE3, la expresión de apoE3-KDEL en las células donadoras Huh7.5-shApoE no mejoró la propagación viral célula a célula en comparación con las células control (vector vacío) (**Figura 33B y C**).



**Figura 33 – La retención de apoE en el RE de las células donadoras impide la propagación célula a célula del HCVcc.** (A) Esquema del ensayo de cocultivo. Las células Huh7.5-shApoE fueron transfecadas con pCAG, pCAG-apoE3 o pCAG-apoE3-KDEL y se infectaron con HCVcc. Estas células se utilizaron como donadoras y las células Huh7.5-GFP-MAVS *naïve* como aceptoras. (B) Análisis por microscopía confocal de la inmunofluorescencia anti-core (rojo) y anti-apoE (azul) de células cocultivadas como en (A). Imágenes representativas. Paneles superior e inferior: en las células donadoras Huh7.5-shApoE que expresan el vector vacío o apoE3-KDEL no se detectó la transmisión del HCV por transferencia célula a célula, tal y como se muestra por la ausencia de *core* y de la GFP citoplasmática en las células aceptoras junto a células donadoras positivas para *core* y negativas para GFP citoplasmática. Panel central: en las células donadoras que expresan apoE3, la transmisión célula a célula del HCVcc se detectó por la presencia de la señal GFP citoplasmática difusa en las células aceptoras junto a células donadoras. Rojo: *core*; Verde: GFP; Azul: apoE. Barras: 50  $\mu$ m. (C) La transmisión célula a célula del HCVcc se cuantificó contando el número de focos con células con GFP citoplasmática (células aceptoras infectadas) en relación al número total de focos positivos para *core* (rojo). Los resultados están presentados como porcentaje relativo al vector vacío y corresponden a dos experimentos independientes por duplicado. La significación estadística fue determinada mediante la prueba ANOVA.

Estos resultados apoyan firmemente que las partículas del HCV responsables de la propagación célula a célula contienen apoE, confirmando así su papel clave en este tipo de transmisión del HCV.



## DISCUSIÓN



## Discusión

En el presente trabajo de investigación hemos estudiado el papel de algunos factores celulares que participan en la infección por el HCV en etapas del ciclo viral en las que previamente no han sido investigados. En concreto, nos centramos en estudiar si clatrina participa en la secreción de partículas virales y si las apolipoproteínas apoB y apoE son importantes en la diseminación del HCV por transmisión célula a célula.

En primer lugar, es importante destacar que atribuir nuevas propiedades a moléculas del huésped que participan en fases distintas de un proceso biológico complejo, como es la infección de los hepatocitos por el HCV, es una tarea ardua y complicada. En numerosas ocasiones ha sido necesario utilizar varias aproximaciones experimentales distintas para demostrar formalmente nuestras hipótesis. Nuestros experimentos han tenido que descartar que los efectos observados fueran debidos a modificaciones en estadios distintos a los analizados ya que, por muy contraintuitivos e improbables que parecieran, dichos fenómenos podrían estar ocurriendo.

En resumen, nuestros resultados demuestran que clatrina y su molécula adaptadora AP-1 participan en la salida del HCVcc desde el interior de los hepatocitos y que existen diferencias en el contenido apolipoproteico de la partícula de HCV que infecta vía transmisión célula a célula en comparación con la que infecta de manera *cell-free*.

### ***Clatrina participa en la salida de partículas infecciosas del HCV***

Clatrina es una proteína que juega un papel esencial en la formación de vesículas recubiertas desde la membrana plasmática, las membranas endosomales y el TGN. La endocitosis y exocitosis de vesículas permite la comunicación intercelular, la transferencia de nutrientes, el tráfico de receptores implicados en captación y vías de señalización, entre otros. Además, clatrina participa en el tráfico intracelular de vesículas hacia distintos orgánulos subcelulares como RE, TGN y los endosomas (31, 99), cuyo contenido será degradado en lisosomas o transportado hacia la membrana plasmática, donde será finalmente liberado por exocitosis (45, 64, 70). Estos procesos requieren la participación coordinada de distintas moléculas adaptadoras, denominadas adaptadores de clatrina, que determinan la identidad de las moléculas transportadas (99). La función celular mejor estudiada de clatrina es su participación en fenómenos de endocitosis, en los que es responsable de la reorganización de

zonas de la membrana plasmática para la formación de vesículas y del consiguiente transporte de moléculas específicas hacia el interior celular. Clatrina es el principal componente estructural de estos procesos formando una red reticular, en conjunto con sus adaptadores, alrededor de las membranas susceptibles de ser internalizadas que posteriormente transitan hacia el interior celular (176).

Son varios los patógenos conocidos que utilizan esta vía de internalización para iniciar una nueva infección celular como es el caso del HCV, el VSV y el virus de la *Influenza* A (22, 139). Por otro lado, experimentos de *screening* masivo con una librería de siRNA han demostrado que algunas proteínas del TGN y de endosomas de reciclaje participan en la exocitosis del HCV (42). También se ha descrito que el silenciamiento del lípido fosfoinosítido PIP<sub>4</sub>, específico del Golgi, bloquea la secreción del HCV sin afectar la replicación con la consiguiente acumulación de viriones en el interior celular (20). Con estos antecedentes y sabiendo además que la internalización del HCV en los hepatocitos es dependiente de la endocitosis mediada por clatrina y dinamina, estudiamos la posible función de clatrina en el ruta de secreción del HCV.

Nuestros resultados, utilizando tanto siRNA específicos para clatrina y su adaptador AP-1 como a través de la inhibición farmacológica de clatrina (pitstop2) y dinamina (dynasore), muestran una clara disminución en la secreción de RNA viral y de viriones infectivos indicando que clatrina, AP-1 y dinamina están involucradas en la salida del HCVcc. Sin embargo, el bloqueo de la secreción del HCVcc observado tras la interferencia de clatrina y AP-1 fue moderado (aproximadamente 40%) en comparación con el alto nivel de silenciamiento conseguido (**Figura 1 y 6**). Estos resultados pueden explicarse por la presencia de cantidades residuales de clatrina y AP-1 que podrían ser suficientes para permitir la liberación del HCV hacia el exterior celular. Además, como previamente se ha demostrado en el estudio de la endocitosis de LDL a través del adaptador AP-2, la inhibición de esta ruta revela la existencia de rutas de transporte alternativas que podrían enmascarar el resultado final del experimento (26, 53). No obstante, cabe destacar que en nuestro estudio, hemos obtenido resultados similares utilizando diferentes estrategias experimentales (silenciamiento versus inhibición farmacológica) y sistemas celulares distintos (Huh7 permanentemente infectadas versus Huh7-Lunet-N electroporadas con RNA viral) sugiriendo firmemente un papel relevante de clatrina y AP-1 en la exocitosis del HCV.

Distintos estudios en células epiteliales polarizadas han puesto de manifiesto que tanto clatrina como AP-1 participan en el tráfico de proteínas de la membrana plasmática basolateral desde el TGN y los endosomas de reciclaje hacia la membrana plasmática (45, 64, 70). De esta forma, es posible que los viriones de HCV interactúen

con alguna de estas proteínas en ruta hacia la membrana plasmática facilitando así la salida viral.

La asociación entre el HCV y las apolipoproteínas observada *in vitro* e *in vivo* ha dado pie a un modelo de secreción viral en el que el virus sigue la ruta secretoria de las VLDL (111). Por este motivo, hemos evaluado si clatrina y AP-1 participan en la secreción de las apolipoproteínas B y E. Nuestros resultados muestran que la secreción de apoB y apoE, valorada tanto por ELISA como por Western blot, no es dependiente de clatrina ni de AP-1 pero sí de dinamina (**Figura 10 y 11**). Así, el papel observado de clatrina y de su adaptador AP-1 en la salida del HCVcc no parece estar directamente relacionado con el bloqueo de la secreción de las apolipoproteínas apoB y apoE lo que cuestiona el actual modelo de secreción viral propuesto. Sin embargo, en nuestros experimentos hemos cuantificado los niveles totales de apoE y apoB y no las fracciones de estas apolipoproteínas asociadas con la partícula viral. Es importante destacar que la cantidad de apoE asociada al virus será probablemente muy inferior a la cantidad total de apoE secretada por la célula, por lo que la reducción de la secreción general de las apolipoproteínas causada por el bloqueo de la exocitosis de las lipoviripartículas de HCV que contienen apolipoproteínas podría ser prácticamente indetectable.

Nuestros estudios de coimmunoprecipitación utilizando lisados de células infectadas con HCVcc (**Figura 15**) sugieren que el HCV se asocia a apoE durante el ensamblaje viral probablemente en el RE. Puesto que la secreción de apoE es independiente de clatrina y AP-1, la ruta exocítica de la lipoviripartícula HCV-apoE diverge en algún punto de la ruta canónica de secreción de apoE. Teniendo en cuenta que apoE es una proteína glicosilada (214) y que el proceso de glicosilación es fundamental para el tráfico polarizado de determinadas proteínas (183), la interacción de proteínas virales con apoE podría modificar su patrón de glicosilación alterando así su ruta de secreción. Alternativamente, las glicoproteínas de la envuelta viral, E1 y E2, podrían interaccionar con una proteína transportadora dirigiendo el virus hacia una ruta exocítica distinta de la ruta natural de las lipoproteínas. Ambas teorías necesitan ser validadas.

Asimismo, nuestros estudios de localización molecular por inmunofluorescencia (**Figura 16**) sugieren que, durante la salida viral, las partículas de HCVcc se asocian a AP-1 en un compartimento post-RE. Sin embargo, para poder concretar el compartimento celular en el cual clatrina interviene en la secreción del HCV sería necesario realizar experimentos de colocalización viral con un mayor número de marcadores de compartimentos celulares. Además, la utilización de proteínas virales

fusionadas a proteínas fluorescentes ha sido también descrita como herramienta útil para el estudio de su tráfico intracelular (42). Utilizar estas herramientas junto con técnicas de videomicroscopía sería de gran utilidad para valorar estas hipótesis. Sin embargo, cabe destacar que la discriminación entre la fracción de proteínas, celulares o virales, que estén participando activamente en la formación de nuevos viriones es metodológicamente muy complicada ya que estos fenómenos parecen ser muy rápidos.

Se ha descrito anteriormente que la perturbación del tráfico intracelular de diferentes proteínas celulares puede interferir con la secreción de algunos virus, induciendo la acumulación de proteínas estructurales virales en lisosomas. Por ejemplo, en el caso del HBV se observó que la inhibición del proceso de adición de N-glicanos resulta en la interrupción del tráfico y secreción de determinadas glicoproteínas provocando la inhibición de la secreción del genoma del HBV y la acumulación de sus proteínas estructurales en compartimentos lisosomales (123). También se ha demostrado que tras la infección con HIV-1 de células deficientes en el receptor NPC1L1, en las cuales el tráfico intracelular de colesterol está impedido generando una acumulación de colesterol y otras proteínas celulares en lisosomas o endosomas tardíos, la proteína de la cápside viral se acumula en estos mismos compartimentos provocando una disminución de la liberación de viriones de HIV-1 infectivos (201). Teniendo en cuenta estos ejemplos, la acumulación observada de la proteína viral *core* en lisosomas tras el silenciamiento de clatrina o AP-1 (**Figura 18B**) podría representar una interrupción en el ensamblaje del HCVcc, antes de que la cápside sea ensamblada en un virión infectivo naciente. Sin embargo, el bloqueo de la ruta RE-Golgi por el tratamiento con BFA conlleva una acumulación intracelular de partículas víricas infectivas (**Figura 15B y C**), lo que parece indicar que el ensamblaje viral ocurre antes de la salida del virión del RE.

Por otro lado, AP-1 está localizada en TGN y en endosomas de reciclaje, ambos compartimentos post-RE en la ruta secretoria, y su asociación con *core* se ve reducida por el tratamiento con BFA (**Figura 16A**), lo que sugiere que el silenciamiento de AP-1 no está interfiriendo con el ensamblaje de la cápside viral. Otra explicación posible es que la acumulación de *core* en lisosomas tras el silenciamiento de clatrina o AP-1 represente la etapa final de la ruta secretoria normal del virión naciente. Para analizar estas hipótesis sería conveniente hacer experimentos de imagen *in vivo* estudiando el tráfico de *core* intracelular (42). Igualmente, el estudio de las rutas de tráfico celulares alteradas por la interferencia de clatrina y AP-1 puede ayudar a descifrar algunos escenarios. En resumen, nuestros resultados bioquímicos y de microscopia confocal (**Figuras 15-18**) sugieren que apoE y AP-1 participan en diferentes fases de la

secreción del HCVcc: apoE interactúa con el virus antes de su salida del RE mientras que AP-1 estaría involucrada en una ruta endosomal tras la salida del virus del RE, lo que permitiría al virión escapar de la degradación lisosomal antes de su secreción final al medio extracelular.

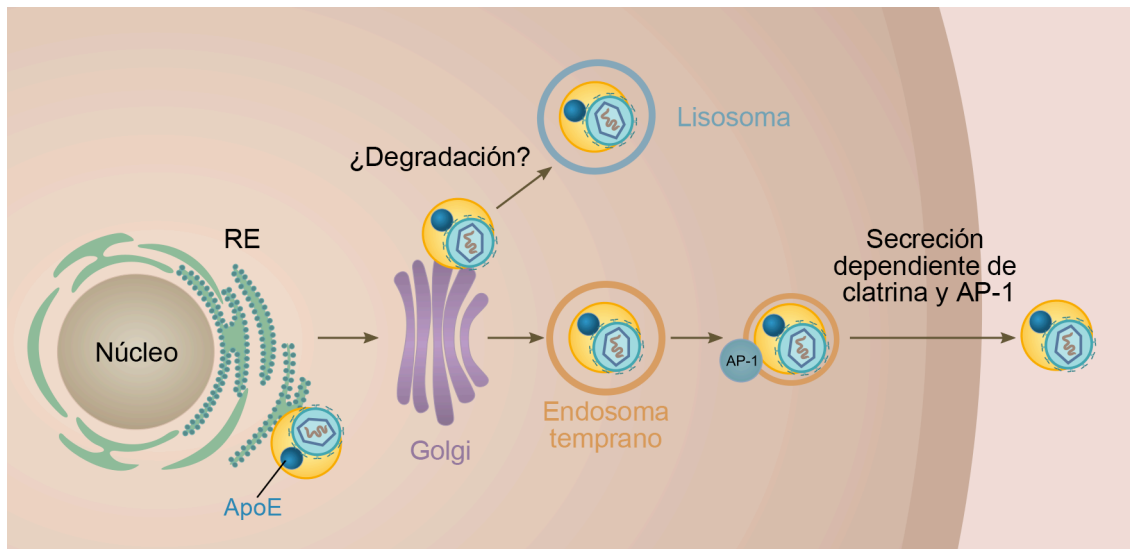
El papel de clatrina en la diseminación viral podría provocar alteraciones celulares que facilitarían la aparición de algunas patologías. Por ejemplo, la infección por reovirus en mamíferos induce una acumulación de clatrina en factorías virales alterando funciones celulares como la endocitosis y secreción mediadas por clatrina (85). La inhibición de rutas de tráfico dependientes de clatrina puede interferir con algunos aspectos de la respuesta inmune innata y adaptativa que dependen del transporte de vesículas, favoreciendo así la persistencia de la infección (85). Además, los cambios en clatrina provocados por infecciones virales pueden causar una pérdida de la polarización epitelial (45) y conllevar un incremento de la diseminación viral (136). En la infección por HCV, estas posibles alteraciones en los procesos celulares dependientes de clatrina no han sido aún estudiadas. Particularmente, se ha observado que en células expresando replicones de HCV, el transporte de MHC de clase I hacia la superficie celular está inhibido (101) y que algunas proteínas asociadas a las uniones intercelulares estrechas están deslocalizadas en la membrana apical (15). Harán falta estudios en profundidad para desvelar si alguno de estos cambios está causado, al menos parcialmente, por modificaciones en las funciones de clatrina inducidas por la infección del HCV.

Curiosamente, nuestros datos en conjunto con los obtenidos recientemente por el grupo liderado por la Dra. Einav, apuntan a que el HCV utiliza todas las proteínas adaptadoras de clatrina presentes en los hepatocitos, AP-1, AP-2 y AP-4, en distintas fases del ciclo viral. AP-1 participa en la salida de los viriones (14), AP-2 es necesaria tanto para el ensamblaje como la salida (152) y AP-4 parece necesario para el paso del HCV a través de TGN (212). La implicación de clatrina en la secreción del HCVcc no descarta su posible participación en el ensamblaje viral. Neveu y colaboradores han demostrado que el adaptador de clatrina AP-2 interacciona con la proteína viral *core* y participa en el ensamblaje del HCVcc (152). Nuestro grupo también obtuvo datos previos muy similares acerca de la participación de AP-2 en el ensamblaje del HCV, que finalmente no fueron publicados ni presentados en esta tesis, ya que la publicación del trabajo citado nos llevó a dejar de lado esta línea de investigación. Sus datos demuestran la existencia de un vínculo entre clatrina y el ensamblaje viral que parece contradecir nuestros resultados en los que tras el silenciamiento de AP-2 no

vimos diferencias significativas en la secreción de RNA viral (**Figura 9**). Sin embargo, cabe resaltar que los abordajes experimentales utilizados fueron distintos. En el trabajo mencionado, las células diana fueron primero transfectadas con siRNA contra AP-2 y después electroporadas con RNA viral, mientras que en el presente trabajo las células fueron primero infectadas permitiendo que la infección se desarrolle antes del silenciamiento de AP-2. De esta forma, en nuestras condiciones es posible que los niveles de viriones ensamblados existentes antes del silenciamiento de AP-2 sean suficientes para enmascarar un posible defecto en el ensamblaje inducido por la ausencia de AP-2. En resumen, mientras que nuestros datos indican que AP-2 parece no estar implicada en la secreción viral, no aportan evidencia acerca de su posible papel en el ensamblaje viral. Interrumpir selectivamente alguna de estas interacciones entre proteínas adaptadoras y proteínas virales puede tener interés terapéutico. Por ejemplo, la inhibición farmacológica de las quinasas reguladoras de la activación de AP-2, la proteína-quinasa 1 asociada a AP-2 (AAK1, del inglés *AP-2-associated protein kinase-1*) y la quinasa asociada a ciclina G (GAK, del inglés *cyclin G-associated kinase*), con los fármacos erlotinib and sunitinib respectivamente, es capaz de bloquear tanto la entrada como el ensamblaje del HCV dependientes de AP-2 (153). Por otro lado, los virus de la familia *Flaviviridae* parecen compartir entre sí mecanismos moleculares secuestrando varios factores celulares en prol de su ciclo viral (59). Un buen ejemplo son los adaptadores de clatrina AP-1 y AP-3 necesarios en distintas etapas del ciclo infectivo de los virus del Dengue, de la encefalitis japonesa y del Nilo Occidental (1). La modulación farmacológica de los adaptadores de clatrina podrían ser dianas ideales para antivirales HTA de amplio espectro. Cabe destacar que algunos de estos fármacos, en concreto las quinasas reguladoras de la actividad de AP-2, están siendo actualmente usados en la práctica médica en el tratamiento de algunos tipos de cáncer, por lo que el futuro de la terapia contra la infección por HCV puede residir en fármacos ya aprobados para el uso en otras enfermedades y que podrían llegar a ser una estrategia terapéutica muy efectiva tanto económicamente como clínicamente (13). Como reflexión general, aunque las terapias dirigidas a factores celulares abren la puerta a nuevas dianas terapéuticas en la lucha contra la hepatitis C, tienen difícil su implantación en la clínica debido al enorme potencial de los DAA.

En conclusión, nuestros datos demuestran la participación de clatrina y AP-1 en la salida del HCVcc contribuyendo a un mejor entendimiento de la patobiología del HCV y abriendo la puerta a una nueva diana terapéutica en la lucha contra la hepatitis C.





**Modelo propuesto de secreción del HCV.** Los viriones de HCV ensamblados interactúan intracelularmente con apoE en el RE. Posteriormente, estos virus se someten a una ronda adicional de lipidación en el Golgi y siguen una ruta transendosomal para salir de la célula de una manera dependiente de clatrina y AP-1. Sin embargo, cuando este tráfico transendosomal está bloqueado por el silenciamiento o inhibición farmacológica de clatrina o AP-1, los viriones de HCV no pueden escapar de la degradación lisosomal.

## **Modelo para el estudio de la transmisión célula a célula del HCV**

En la segunda parte de este trabajo hemos utilizado conjuntamente dos herramientas previamente descritas para estudiar la transmisión célula a célula del HCV *in vitro*. Por un lado, hemos utilizado las células Huh7.5-GFP-MAVS, en las que es posible monitorizar la infección del HCV ya que la proteína MAVS, acoplada a la proteína fluorescente GFP, se redistribuye desde la mitocondria al citosol tras la infección con HCVcc (36). Por otro lado, hemos eliminado la infección *cell-free* mediante la adición de anticuerpos bloqueantes y/o de medio de cultivo semisólido tras añadir agarosa al 1% (**Figuras 19-21**). Este sistema es un método sencillo, versátil, sensible, específico y robusto que permite estudiar la transmisión célula a célula del HCV. Aunque los experimentos aquí descritos fueron realizados en células en división que fueron posteriormente fijadas para su análisis por microscopía, este sistema también podrá utilizarse en células quiescentes, como los hepatocitos infectados en el curso de una infección natural, y monitorizando la infección en tiempo real. Finalmente es necesario destacar que aunque en el momento en el que realizamos este estudio no había sido publicado ningún método análogo, son varios los artículos publicados recientemente que utilizan aproximaciones experimentales muy similares (37, 80, 103), lo cual si bien resta cierta novedad al desarrollo del método en sí mismo, evidencia la utilidad y versatilidad del mismo.

## **ApoB no interviene en la transmisión célula a célula del HCV**

La infección por transmisión célula a célula parece ser una ruta importante de diseminación del HCV *in vivo*, facilitando además la persistencia viral y la cronificación de la infección hepática (36, 47, 148). Varios estudios basados en el silenciamiento de la expresión o en la utilización de líneas celulares deficientes en alguno de los receptores virales, han confirmado que esta ruta de infección es dependiente de la presencia de los correceptores virales SR-BI, CD81, claudina-1, ocludina y NPC1L1 (9, 30, 142, 203) sugiriendo que los mecanismos de la entrada viral por transmisión célula a célula son muy similares a los descritos para la ruta de infección extracelular (*cell-free*). Curiosamente, al contrario que otros virus que también se diseminan por transmisión célula a célula, no se ha descrito la existencia de estructuras

intercelulares, como por ejemplo nanotubos, que puedan estar intermediando esta ruta de diseminación viral (148). Además, el HCVcc, al menos *in vitro*, puede transmitirse a través de exosomas (43) o incluso transmitir su genoma sin estar incluido en el virión (122). Conviene destacar que aunque estas formas de transmisión viral podrían considerarse célula a célula, son altamente ineficaces por lo que tendrían escasa o nula relevancia en nuestro sistema. Por otro lado, los aspectos relacionados con el ensamblaje y maduración de los viriones que infectan a través de la ruta célula a célula no habían sido estudiados.

Utilizando el método aquí descrito estudiamos las proteínas relacionadas con el ensamblaje de las partículas virales del HCV, como son las apolipoproteínas B y E. Durante la realización de los experimentos para este trabajo, dos estudios fueron publicados desvelando el papel de apoE y apoB en la infección célula a célula por el HCV. Por un lado, el trabajo de Hueging y colaboradores describe la participación de apoE en la transmisión célula a célula del HCV (80), mientras que Barreto y colaboradores defienden que ni apoB ni apoE participan en la infección célula a célula del HCV (9). Nuestros resultados (**Figuras 22-24**) muestran que existen diferencias significativas en la implicación de apoB y apoE en esta ruta de infección de manera que la presencia de apoE es fundamental mientras que apoB no es imprescindible. Estos datos apoyarían los argumentos defendidos por Hueging *et al.*, aunque cabe destacar que los autores no analizan en profundidad el papel de apoE ni estudian el papel de apoB ya que este trabajo es una prueba de principio en la que otra estirpe celular distinta a los hepatocitos puede participar en este tipo de infección (80). Las discrepancias con los datos publicados por Barreto *et al.* (9) respecto a la implicación de apoE podrían explicarse teniendo en cuenta los diferentes abordajes experimentales utilizados. En el estudio de Barreto y cols., los datos se analizaron tras 5 días de infección con HCVcc y la interferencia de la expresión de apoE con siRNA se realizó antes de la inoculación con el virus. Además se excluyeron del estudio los focos de infección con menos de 3 células. En nuestro trabajo, la infección progresó durante 3 días y la interferencia de apoB y apoE con siRNA fue realizada 6 h después de la inoculación con HCVcc. Además todos los focos fueron contabilizados, independientemente de su tamaño. Particularmente, durante nuestros experimentos observamos que en la condición de silenciamiento de apoE, un número significativo de focos pequeños no se expandieron sugiriendo que estas células infectadas fueron incapaces de transferir su carga viral a las células adyacentes (**Figura 22B**). Igualmente, la observación de focos monocelulares exclusivamente en células silenciadas para apoE refuerza la hipótesis de la participación de apoE en la ruta de

transmisión célula a célula del HCV. Estos datos indican que la exclusión de focos pequeños puede subestimar el efecto del silenciamiento de apoE.

La infección célula a célula del HCV depende de la densidad celular, ya que es necesario que existan contactos celulares para que tenga lugar (118) y es más eficiente en células en proliferación que en células quiescentes (140). La división mitótica de una célula infectada resulta en dos células infectadas pero no es consecuencia directa de una verdadera transmisión viral célula a célula. En el presente trabajo, los ensayos de transmisión célula a célula se realizaron en células en división, lo que con toda seguridad nos llevó a una sobrestimación de los eventos de infección célula a célula. Sin embargo, hemos comprobado que ni el silenciamiento de apoB ni de apoE alteraron la capacidad de proliferación celular (**Figura 22D**), indicando que los posibles sesgos en nuestros datos aparecerían en todas las condiciones experimentales analizadas por igual, hecho que permite hacer comparaciones entre ellas. Así, el menor tamaño de foco observado en las células con silenciamiento de apoE no puede ser debido a una menor tasa de proliferación tras silenciar la expresión de apoE sino a un efecto directo en la progresión de la infección. Por otra parte, nuestros resultados apuntan a que ni apoB ni apoE participan en la entrada o en la replicación viral, ni en la expresión de la proteína de la cápside *core* y de los cuatro receptores canónicos del HCV analizados (**Figuras 26 y 27**). Estos datos son consistentes con trabajos anteriores (19, 65, 78), pero no podemos descartar un posible efecto del silenciamiento de apoB y apoE sobre otras etapas del ciclo del HCV no analizadas. Por ejemplo, se ha demostrado que en células endoteliales, apoE regula las funciones de proteínas asociadas a TJ (155). Las TJ son estructuras celulares cuya integridad podría afectar, favoreciendo o limitando, la entrada o salida del HCV de los hepatocitos (18). Serían necesarios estudios específicos para determinar si el silenciamiento en la expresión de apoE afecta la funcionalidad de las TJ en células hepáticas y sus posibles consecuencias en la entrada/salida viral.

ApoE ha sido descrita ampliamente como necesaria para el ensamblaje e infectividad del HCVcc (19, 39, 75) pero el papel de apoB es controvertido (87). Nuestras observaciones en un contexto de infección en el que tanto la ruta *cell-free* como célula a célula tienen lugar, muestran que ambas apolipoproteínas son fundamentales para el ensamblaje y secreción de partículas virales infectivas (**Figura 28**). En el sistema de transmisión célula a célula observamos también una reducción en los niveles de virus infectivos intracelulares tras ambos silenciamientos (**Figura 29**). No obstante, en este caso, la reducción de la infectividad con el silenciamiento de apoE puede ser explicada por el bloqueo de la transmisión célula a célula resultando en un número menor de

células infectadas y consecuentemente en menos virus ensamblados. Es decir, en este experimento no se puede discernir si los niveles reducidos de viriones infectivos en células con silenciamiento en apoE se deben a un defecto en el ensamblaje o si son consecuencia de un número reducido de células infectadas por transmisión célula a célula. Sin embargo, el dato clave de este experimento corresponde a la observación de una disminución de los niveles de virus infectivos intracelulares con el silenciamiento de apoB a pesar de que no hay alteración en la transmisión célula a célula del HCVcc (**Figura 22-24**). Estos resultados indican que la composición lipoproteica de las partículas víricas que infectan por paso célula a célula puede ser distinta de las que infectan vía *cell-free*.

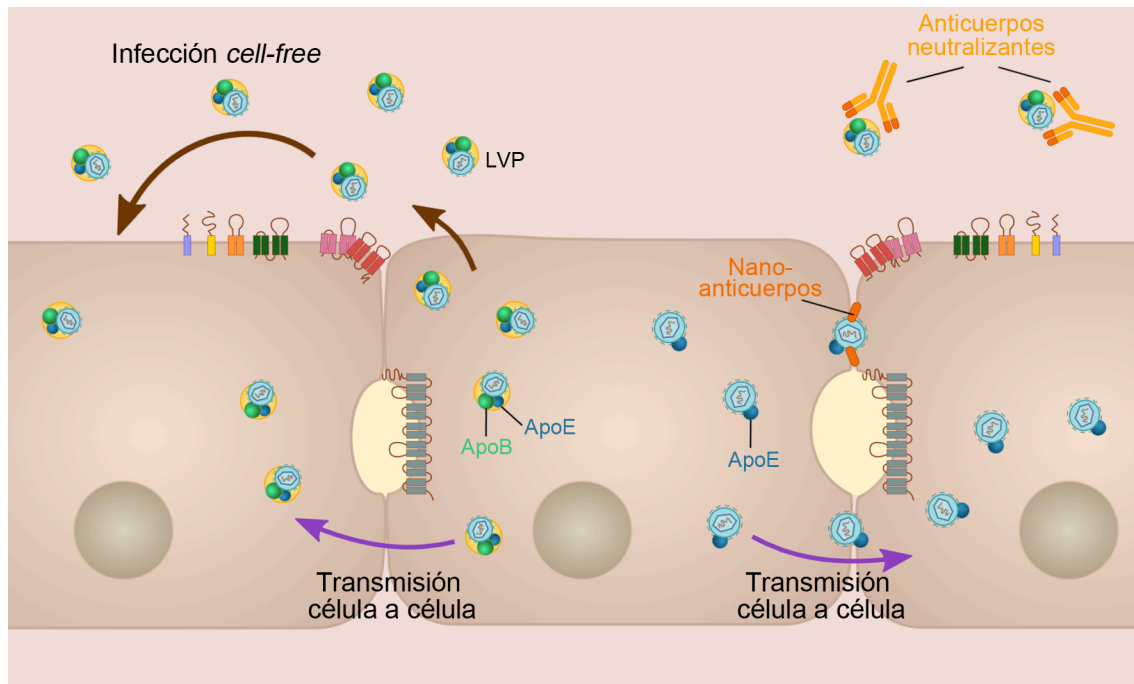
Seguidamente, comprobamos que la importancia de apoE en la transmisión célula a célula del HCVcc está restringida a las células donadoras (**Figura 31**). Trabajos anteriores demostraron que la diseminación célula a célula depende tanto de la encapsidación del genoma (30) como de la presencia de las glicoproteínas de la envuelta del HCV (202). Sin embargo, la naturaleza y composición de la partícula vírica infectiva a través del paso célula a célula es desconocida. Nuestros experimentos con el anticuerpo policlonal anti-apoE demostraron que éste bloquea, al menos parcialmente, la infección *cell-free*, pero no bloquea la infección célula a célula del HCVcc (**Figura 25**). Estos resultados aparentemente contradictorios con nuestra hipótesis están sin embargo en consonancia con otros estudios anteriores en los que se observa como anticuerpos, mono o policlonales, dirigidos contra las glicoproteínas de la envuelta viral son incapaces de bloquear la transmisión célula a célula (30, 203, 218). No obstante, anticuerpos de dominio simple o nanoanticuerpos contra las glicoproteínas de la envuelta viral bloquean efectivamente la infectividad célula a célula (202), sugiriendo que los anticuerpos convencionales no son capaces de acceder por su tamaño a la zona intercelular dónde tiene lugar esta ruta de infección.

Alternativamente, utilizamos una construcción de apoE fusionada a una secuencia de retención en el RE, KDEL. En estas condiciones, la apolipoproteína E queda retenida en el interior celular y no es secretada al exterior celular. Tras la expresión ectópica de la construcción apoE-KDEL en células infectadas, observamos un incremento en la infectividad intracelular y una disminución en la infectividad extracelular (**Figura 32**), de acuerdo con lo publicado anteriormente (75). Además, se observó una disminución de la transmisión célula a célula del HCVcc (**Figura 33**). Sin ser una prueba definitiva, este dato sugiere que apoE está presente en la partícula del HCV capaz de infectar a través de transmisión célula a célula.

De acuerdo con nuestros resultados, apoE podría ser el mínimo componente lipoproteico necesario para que una partícula viral sea infectiva en ambas vías de diseminación del HCV. ApoE podría conferir al virus la capacidad de interactuar con receptores celulares y promover una infección productiva, como previamente se ha sugerido en otros estudios (75, 86, 116, 159). Alternativamente, apoE podría aumentar la estabilidad de la partícula viral previniendo su desensamblaje antes de salir de una célula infectada al espacio extra o intercelular. Por otro lado, apoB puede ser incorporada al virus para favorecer así su salida desde células infectadas al espacio extracelular, como la sangre, donde el conjunto de apolipoproteínas pueden jugar un papel más determinante al enmascarar los epítopos virales de las defensas del sistema inmune del huésped. Además, apoE podría aumentar la infectividad *cell-free* del HCV dependiendo de la disponibilidad o abundancia de receptores celulares presentes en la superficie de las células diana. Las diferencias en los requerimientos de apolipoproteínas sugieren que también es probable que la densidad y tamaño del virus o su sensibilidad a la neutralización por anticuerpos sean diferentes dependiendo de la ruta de diseminación viral seguida. Serían necesarios experimentos adicionales para validar estas hipótesis. Es también plausible que, dependiendo de las condiciones experimentales, como por ejemplo, el genotipo viral, la contribución relativa de estas dos rutas de diseminación viral sea distinta y, consecuentemente, su dependencia de apoB y apoE (57, 140). Además, se ha descrito que mutantes puntuales concretos tienen una preferencia por una u otra vía de diseminación viral (132).

Dada la heterogeneidad de la línea celular Huh7 y sus clones utilizados por distintos laboratorios de investigación (186), estas consideraciones podrían explicar parcialmente las discrepancias existentes entre distintos estudios relativamente al papel de apoB en la infección por HCV. Finalmente, las células usadas en nuestros experimentos, Huh7 y sus derivados, no son capaces de sintetizar verdaderas VLDL, al menos al nivel observado en hepatocitos primarios. Habría que confirmar en el futuro los datos aquí presentados en un sistema de hepatocitos que produzca VLDL *bona fide*.

En conclusión, este trabajo ha puesto de manifiesto el papel diferencial que juegan apoB y apoE en la transmisión célula a célula del HCV, revelando diferencias específicas entre las dos rutas de infección por el HCV, en cuanto a su requerimiento en apolipoproteínas, que podrán ser útiles en el desarrollo de terapias más eficaces contra el HCV.



**Modelo propuesto de la infección del HCV por transmisión célula a célula.** Los virus son producidos en los hepatocitos en asociación con lipoproteínas. Los virus son secretados al medio extracelular como lipoviropartículas (LVP), en asociación con apoB (verde) y apoE (azul), y son susceptibles de ser neutralizados por anticuerpos bloqueantes frente a componentes de la partícula viral (glicoproteínas virales o apoE). Estas LVP son capaces de infectar las células a través de las rutas *cell-free* (flechas marrones) y célula a célula (flechas moradas). Los virus que tengan en su composición lipídica solo apoE constituyen la estructura viral mínima infectiva por transmisión célula a célula. Esta ruta de infección puede ser bloqueada por nanoanticuerpos dirigidos a las glicoproteínas virales.





## CONCLUSIONES



## Conclusiones

1. Clatrina, la proteína adaptadora AP-1 y dinamina participan en la salida de viriones infectivos del virus de la hepatitis C producidos en cultivo celular (HCVcc);
2. La secreción de apolipoproteínas B (apoB) y E (apoE) depende de dinamina pero no de clatrina ni de AP-1;
3. La ruta de secreción de HCVcc no es totalmente paralela a la ruta canónica de secreción de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL);
4. Las partículas de HCVcc durante su ensamblaje en el retículo endoplásmico se asocian a apoE y siguen una ruta exocítica transendosomal dependiente de AP-1 y clatrina escapando así de la degradación lisosomal;
5. La ruta de transmisión célula a célula del HCV es dependiente de apoE pero no de apoB;
6. Las apolipoproteínas apoE y apoB intervienen en el ensamblaje de virus infectivos por infección *cell-free* mientras que sólo apoE es determinante para la infectividad del HCVcc por transmisión célula a célula;
7. La presencia de apoE en la partícula vírica desde la célula donadora es fundamental para la transmisión célula a célula del HCVcc a una célula aceptora, no infectada.



## BIBLIOGRAFÍA



## Bibliografía

1. **Agrawal T, Schu P, Medigeshi GR.** 2013. Adaptor protein complexes-1 and 3 are involved at distinct stages of flavivirus life-cycle. *Sci Rep* **3**:1813.
2. **Alter HJ, Holland PV, Morrow AG, Purcell RH, Feinstone SM, Moritsugu Y.** 1975. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet* **2**:838-841.
3. **Alter MJ.** 2007. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* **13**:2436-2441.
4. **Amako Y, Tsukiyama-Kohara K, Katsume A, Hirata Y, Sekiguchi S, Tobita Y, Hayashi Y, Hishima T, Funata N, Yonekawa H, Kohara M.** 2010. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri*. *J Virol* **84**:303-311.
5. **Appel N, Zayas M, Miller S, Krijnse-Locker J, Schaller T, Friebe P, Kallis S, Engel U, Bartenschlager R.** 2008. Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog* **4**:e1000035.
6. **Ariumi Y, Kuroki M, Maki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N.** 2011. The ESCRT system is required for hepatitis C virus production. *PLoS One* **6**:e14517.
7. **Backes P, Quinkert D, Reiss S, Binder M, Zayas M, Rescher U, Gerke V, Bartenschlager R, Lohmann V.** 2010. Role of annexin A2 in the production of infectious hepatitis C virus particles. *J Virol* **84**:5775-5789.
8. **Baldick CJ, Wichroski MJ, Pendri A, Walsh AW, Fang J, Mazzucco CE, Pokornowski KA, Rose RE, Eggers BJ, Hsu M, Zhai W, Zhai G, Gerritz SW, Poss MA, Meanwell NA, Cockett MI, Tenney DJ.** 2010. A novel small molecule inhibitor of hepatitis C virus entry. *PLoS Pathog* **6**:e1001086.
9. **Barretto N, Sainz B, Jr., Hussain S, Uprichard SL.** 2014. Determining the involvement and therapeutic implications of host cellular factors in hepatitis C virus cell-to-cell spread. *J Virol* **88**:5050-5061.
10. **Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V, Andre P.** 2011. Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol* **19**:95-103.
11. **Bartosch B, Bukh J, Meunier JC, Granier C, Engle RE, Blackwelder WC, Emerson SU, Cosset FL, Purcell RH.** 2003. In vitro assay for neutralizing

- antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:14199-14204.
12. **Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL.** 2003. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* **197**:633-642.
  13. **Bekerman E, Einav S.** 2015. Infectious disease. Combating emerging viral threats. *Science* **348**:282-283.
  14. **Benedicto I, Gondar V, Molina-Jimenez F, Garcia-Buey L, Lopez-Cabrera M, Gastaminza P, Majano PL.** 2015. Clathrin mediates infectious hepatitis C virus particle egress. *J Virol* **89**:4180-4190.
  15. **Benedicto I, Molina-Jimenez F, Barreiro O, Maldonado-Rodriguez A, Prieto J, Moreno-Otero R, Aldabe R, Lopez-Cabrera M, Majano PL.** 2008. Hepatitis C virus envelope components alter localization of hepatocyte tight junction-associated proteins and promote occludin retention in the endoplasmic reticulum. *Hepatology* **48**:1044-1053.
  16. **Benedicto I, Molina-Jimenez F, Bartosch B, Cosset FL, Lavillette D, Prieto J, Moreno-Otero R, Valenzuela-Fernandez A, Aldabe R, Lopez-Cabrera M, Majano PL.** 2009. The tight junction-associated protein occludin is required for a postbinding step in hepatitis C virus entry and infection. *J Virol* **83**:8012-8020.
  17. **Benedicto I, Molina-Jimenez F, Garcia-Buey L, Gondar V, Lopez-Cabrera M, Moreno-Otero R, Majano PL.** 2012. Role of tight junctions in hepatitis C virus infection. *Rev Esp Enferm Dig* **104**:255-263.
  18. **Benedicto I, Molina-Jimenez F, Moreno-Otero R, Lopez-Cabrera M, Majano PL.** 2011. Interplay among cellular polarization, lipoprotein metabolism and hepatitis C virus entry. *World J Gastroenterol* **17**:2683-2690.
  19. **Benga WJ, Krieger SE, Dimitrova M, Zeisel MB, Parnot M, Lupberger J, Hildt E, Luo G, McLauchlan J, Baumert TF, Schuster C.** 2010. Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology* **51**:43-53.
  20. **Bishe B, Syed GH, Field SJ, Siddiqui A.** 2012. Role of phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) and its binding protein GOLPH3 in hepatitis C virus secretion. *J Biol Chem* **287**:27637-27647.
  21. **Bitzegeio J, Bankwitz D, Hueging K, Haid S, Brohm C, Zeisel MB, Herrmann E, Iken M, Ott M, Baumert TF, Pietschmann T.** 2010. Adaptation of hepatitis C virus to mouse CD81 permits infection of mouse cells in the absence of human entry factors. *PLoS Pathog* **6**:e1000978.



22. **Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, Rouille Y.** 2006. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* **80**:6964-6972.
23. **Blight KJ, McKeating JA, Rice CM.** 2002. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* **76**:13001-13014.
24. **Bonazzi M, Spano S, Turacchio G, Cericola C, Valente C, Colanzi A, Kweon HS, Hsu VW, Polishchuck EV, Polishchuck RS, Sallèse M, Pulvirenti T, Corda D, Luini A.** 2005. CtBP3/BARS drives membrane fission in dynamin-independent transport pathways. *Nat Cell Biol* **7**:570-580.
25. **Bouchard MJ, Navas-Martin S.** 2011. Hepatitis B and C virus hepatocarcinogenesis: lessons learned and future challenges. *Cancer Lett* **305**:123-143.
26. **Boucrot E, Saffarian S, Zhang R, Kirchhausen T.** 2010. Roles of AP-2 in clathrin-mediated endocytosis. *PLoS One* **5**:e10597.
27. **Boyer A, Dumans A, Beaumont E, Etienne L, Roingeard P, Meunier JC.** 2014. The association of hepatitis C virus glycoproteins with apolipoproteins E and B early in assembly is conserved in lipoviral particles. *J Biol Chem* **289**:18904-18913.
28. **Branch AD, Stump DD, Gutierrez JA, Eng F, Walewski JL.** 2005. The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. *Semin Liver Dis* **25**:105-117.
29. **Brazzoli M, Bianchi A, Filippini S, Weiner A, Zhu Q, Pizza M, Crotta S.** 2008. CD81 is a central regulator of cellular events required for hepatitis C virus infection of human hepatocytes. *J Virol* **82**:8316-8329.
30. **Brimacombe CL, Grove J, Meredith LW, Hu K, Syder AJ, Flores MV, Timpe JM, Krieger SE, Baumert TF, Tellinghuisen TL, Wong-Staal F, Balfe P, McKeating JA.** 2011. Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus cell-to-cell transmission. *J Virol* **85**:596-605.
31. **Brodsky FM.** 2012. Diversity of clathrin function: new tricks for an old protein. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**:309-336.
32. **Burlone ME, Budkowska A.** 2009. Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. *J Gen Virol* **90**:1055-1070.
33. **Cacoub P, Gragnani L, Comarmond C, Zignego AL.** 2014. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C virus infection. *Dig Liver Dis* **46 Suppl 5**:S165-173.

34. **Calland N, Albecka A, Belouzard S, Wychowski C, Duverlie G, Descamps V, Hober D, Dubuisson J, Rouille Y, Seron K.** 2011. (-)-Epigallocatechin-3-gallate is a new inhibitor of hepatitis C virus entry. *Hepatology* **55**:720-729.
35. **Cannalire R, Barreca ML, Manfroni G, Cecchetti V.** 2015. A journey around the medicinal chemistry of hepatitis C virus inhibitors targeting NS4B: from target to preclinical drug candidates. *J Med Chem* (**en prensa**).
36. **Carlioni G, Crema A, Valli MB, Ponzetto A, Clementi M.** 2012. HCV infection by cell-to-cell transmission: choice or necessity? *Curr Mol Med* **12**:83-95.
37. **Catanese MT, Loureiro J, Jones CT, Dorner M, von Hahn T, Rice CM.** 2013. Different requirements for scavenger receptor class B type I in hepatitis C virus cell-free versus cell-to-cell transmission. *J Virol* **87**:8282-8293.
38. **Catanese MT, Uryu K, Kopp M, Edwards TJ, Andrus L, Rice WJ, Silvestry M, Kuhn RJ, Rice CM.** 2013. Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:9505-9510.
39. **Chang KS, Jiang J, Cai Z, Luo G.** 2007. Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J Virol* **81**:13783-13793.
40. **Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M.** 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**:359-362.
41. **Codran A, Royer C, Jaeck D, Bastien-Valle M, Baumert TF, Kieny MP, Pereira CA, Martin JP.** 2006. Entry of hepatitis C virus pseudotypes into primary human hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. *J Gen Virol* **87**:2583-2593.
42. **Coller KE, Heaton NS, Berger KL, Cooper JD, Saunders JL, Randall G.** 2012. Molecular determinants and dynamics of hepatitis C virus secretion. *PLoS Pathog* **8**:e1002466.
43. **Cosset FL, Dreux M.** 2014. HCV transmission by hepatic exosomes establishes a productive infection. *J Hepatol* **60**:674-675.
44. **Counihan NA, Rawlinson SM, Lindenbach BD.** 2011. Trafficking of hepatitis C virus core protein during virus particle assembly. *PLoS Pathog* **7**:e1002302.
45. **Deborde S, Perret E, Gravotta D, Deora A, Salvarezza S, Schreiner R, Rodriguez-Boulan E.** 2008. Clathrin is a key regulator of basolateral polarity. *Nature* **452**:719-723.
46. **Decaens C, Durand M, Grosse B, Cassio D.** 2008. Which in vitro models could be best used to study hepatocyte polarity? *Biol Cell* **100**:387-398.

47. **Di Lorenzo C, Angus AG, Patel AH.** 2011. Hepatitis C virus evasion mechanisms from neutralizing antibodies. *Viruses* **3**:2280-2300.
48. **Ding Q, von Schaewen M, Ploss A.** 2014. The Impact of Hepatitis C Virus Entry on Viral Tropism. *Cell Host Microbe* **16**:562-568.
49. **Dorner M, Horwitz JA, Robbins JB, Barry WT, Feng Q, Mu K, Jones CT, Schoggins JW, Catanese MT, Burton DR, Law M, Rice CM, Ploss A.** 2011. A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. *Nature* **474**:208-211.
50. **Dorner M, Ploss A.** 2011. Deconstructing hepatitis C virus infection in humanized mice. *Ann N Y Acad Sci* **1245**:59-62.
51. **Dubuisson J, Cosset FL.** 2014. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle--an update. *J Hepatol* **61**:S3-S13.
52. **Dustin LB, Rice CM.** 2007. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. *Annu Rev Immunol* **25**:71-99.
53. **Ehrlich M, Boll W, Van Oijen A, Hariharan R, Chandran K, Nibert ML, Kirchhausen T.** 2004. Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. *Cell* **118**:591-605.
54. **Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, Hatzioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM.** 2007. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* **446**:801-805.
55. **Feeney ER, Chung RT.** 2014. Antiviral treatment of hepatitis C. *BMJ* **348**:g3308.
56. **Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV.** 1975. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* **292**:767-770.
57. **Feneant L, Potel J, Francois C, Sane F, Douam F, Belouzard S, Calland N, Vausselin T, Rouille Y, Descamps V, Baumert TF, Duverlie G, Lavillette D, Hober D, Dubuisson J, Wychowski C, Cocquerel L.** 2015. New Insights into the Understanding of Hepatitis C Virus Entry and Cell-to-Cell Transmission by Using the Ionophore Monensin A. *J Virol* **89**:8346-8364.
58. **Ferguson SM, De Camilli P.** 2012. Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**:75-88.
59. **Fernandez-Garcia MD, Mazzon M, Jacobs M, Amara A.** 2009. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. *Cell Host Microbe* **5**:318-328.

60. **Frentzen A, Anggakusuma, Gurlevik E, Hueging K, Knocke S, Ginkel C, Brown RJ, Heim M, Dill MT, Kroger A, Kalinke U, Kaderali L, Kuehnel F, Pietschmann T.** 2014. Cell entry, efficient RNA replication, and production of infectious hepatitis C virus progeny in mouse liver-derived cells. *Hepatology* **59**:78-88.
61. **Friebe P, Bartenschlager R.** 2002. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol* **76**:5326-5338.
62. **Friebe P, Lohmann V, Krieger N, Bartenschlager R.** 2001. Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* **75**:12047-12057.
63. **Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S.** 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* **123**:1777-1788.
64. **Gan Y, McGraw TE, Rodriguez-Boulan E.** 2002. The epithelial-specific adaptor AP1B mediates post-endocytic recycling to the basolateral membrane. *Nat Cell Biol* **4**:605-609.
65. **Gastaminza P, Cheng G, Wieland S, Zhong J, Liao W, Chisari FV.** 2008. Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J Virol* **82**:2120-2129.
66. **Gastaminza P, Dryden KA, Boyd B, Wood MR, Law M, Yeager M, Chisari FV.** 2010. Ultrastructural and biophysical characterization of hepatitis C virus particles produced in cell culture. *J Virol* **84**:10999-11009.
67. **Gastaminza P, Kapadia SB, Chisari FV.** 2006. Differential biophysical properties of infectious intracellular and secreted hepatitis C virus particles. *J Virol* **80**:11074-11081.
68. **Gelman MA, Glenn JS.** 2010. Mixing the right hepatitis C inhibitor cocktail. *Trends Mol Med* **17**:34-46.
69. **Giang E, Dorner M, Prentoe JC, Dreux M, Evans MJ, Bukh J, Rice CM, Ploss A, Burton DR, Law M.** 2012. Human broadly neutralizing antibodies to the envelope glycoprotein complex of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:6205-6210.
70. **Gravotta D, Carvajal-Gonzalez JM, Mattera R, Deborde S, Banfelder JR, Bonifacino JS, Rodriguez-Boulan E.** 2012. The clathrin adaptor AP-1A mediates basolateral polarity. *Dev Cell* **22**:811-823.
71. **Haque S, Chandra B, Gerber MA, Lok AS.** 1996. Iron overload in patients with chronic hepatitis C: a clinicopathologic study. *Hum Pathol* **27**:1277-1281.

72. **Harris HJ, Davis C, Mullins JG, Hu K, Goodall M, Farquhar MJ, Mee CJ, McCaffrey K, Young S, Drummer H, Balfe P, McKeating JA.** 2010. Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. *J Biol Chem* **285**:21092-21102.
73. **Helle F, Vieyres G, Elkrief L, Popescu CI, Wychowski C, Descamps V, Castelain S, Roingeard P, Duverlie G, Dubuisson J.** 2010. Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope proteins incorporated into infectious virions. *J Virol* **84**:11905-11915.
74. **Herker E, Harris C, Hernandez C, Carpentier A, Kaehlcke K, Rosenberg AR, Farese RV, Jr., Ott M.** 2010. Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nat Med* **16**:1295-1298.
75. **Hishiki T, Shimizu Y, Tobita R, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Ohsaki Y, Fujimoto T, Takaku H, Wakita T, Baumert TF, Miyanari Y, Shimotohno K.** 2010. Infectivity of hepatitis C virus is influenced by association with apolipoprotein E isoforms. *J Virol* **84**:12048-12057.
76. **Hsu M, Zhang J, Flint M, Logvinoff C, Cheng-Mayer C, Rice CM, McKeating JA.** 2003. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:7271-7276.
77. **Huang C, Chang SC, Yang HC, Chien CL, Chang MF.** 2009. Clathrin-mediated post-Golgi membrane trafficking in the morphogenesis of hepatitis delta virus. *J Virol* **83**:12314-12324.
78. **Huang H, Sun F, Owen DM, Li W, Chen Y, Gale M, Jr., Ye J.** 2007. Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:5848-5853.
79. **Huang Y, Staschke K, De Francesco R, Tan SL.** 2007. Phosphorylation of hepatitis C virus NS5A nonstructural protein: a new paradigm for phosphorylation-dependent viral RNA replication? *Virology* **364**:1-9.
80. **Hueging K, Doepke M, Vieyres G, Bankwitz D, Frentzen A, Doerrbecker J, Gumz F, Haid S, Wolk B, Kaderali L, Pietschmann T.** 2014. Apolipoprotein E codetermines tissue tropism of hepatitis C virus and is crucial for viral cell-to-cell transmission by contributing to a postenvelopment step of assembly. *J Virol* **88**:1433-1446.
81. **Humphries AC, Dodding MP, Barry DJ, Collinson LM, Durkin CH, Way M.** 2012. Clathrin potentiates vaccinia-induced actin polymerization to facilitate viral spread. *Cell Host Microbe* **12**:346-359.

82. **Icard V, Diaz O, Scholtes C, Perrin-Cocon L, Ramiere C, Bartenschlager R, Penin F, Lotteau V, Andre P.** 2009. Secretion of hepatitis C virus envelope glycoproteins depends on assembly of apolipoprotein B positive lipoproteins. *PLoS One* **4**:e4233.
83. **Ishida S, Kaito M, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K, Fujita N, Ikoma J, Adachi Y, Watanabe S.** 2001. Hepatitis C virus core particle detected by immunoelectron microscopy and optical rotation technique. *Hepatology Res* **20**:335-347.
84. **Ishido S, Fujita T, Hotta H.** 1998. Complex formation of NS5B with NS3 and NS4A proteins of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* **244**:35-40.
85. **Ivanovic T, Boulant S, Ehrlich M, Demidenko AA, Arnold MM, Kirchhausen T, Nibert ML.** 2011. Recruitment of cellular clathrin to viral factories and disruption of clathrin-dependent trafficking. *Traffic* **12**:1179-1195.
86. **Jiang J, Cun W, Wu X, Shi Q, Tang H, Luo G.** 2012. Hepatitis C virus attachment mediated by apolipoprotein E binding to cell surface heparan sulfate. *J Virol* **86**:7256-7267.
87. **Jiang J, Luo G.** 2009. Apolipoprotein E but not B is required for the formation of infectious hepatitis C virus particles. *J Virol* **83**:12680-12691.
88. **Jiang J, Wu X, Tang H, Luo G.** 2013. Apolipoprotein E mediates attachment of clinical hepatitis C virus to hepatocytes by binding to cell surface heparan sulfate proteoglycan receptors. *PLoS One* **8**:e67982.
89. **Jirasko V, Montserret R, Lee JY, Gouttenoire J, Moradpour D, Penin F, Bartenschlager R.** 2010. Structural and functional studies of nonstructural protein 2 of the hepatitis C virus reveal its key role as organizer of virion assembly. *PLoS Pathog* **6**:e1001233.
90. **Jones CT, Catanese MT, Law LM, Khetani SR, Syder AJ, Ploss A, Oh TS, Schoggins JW, MacDonald MR, Bhatia SN, Rice CM.** 2010. Real-time imaging of hepatitis C virus infection using a fluorescent cell-based reporter system. *Nat Biotechnol* **28**:167-171.
91. **Jones CT, Murray CL, Eastman DK, Tassello J, Rice CM.** 2007. Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J Virol* **81**:8374-8383.
92. **Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P.** 2005. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* **309**:1577-1581.
93. **Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Kobayashi Y, Konishi M, Yokoi M, Ishida S, Suzuki S, Kohara M.** 1994. Hepatitis C virus

- particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol* **75**:1755-1760.
94. **Kato N, Sugiyama K, Namba K, Dansako H, Nakamura T, Takami M, Naka K, Nozaki A, Shimotohno K.** 2003. Establishment of a hepatitis C virus subgenomic replicon derived from human hepatocytes infected in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **306**:756-766.
  95. **Kato T, Date T, Miyamoto M, Furusaka A, Tokushige K, Mizokami M, Wakita T.** 2003. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* **125**:1808-1817.
  96. **Kato T, Date T, Murayama A, Morikawa K, Akazawa D, Wakita T.** 2006. Cell culture and infection system for hepatitis C virus. *Nat Protoc* **1**:2334-2339.
  97. **Khudyakov Y.** 2012. Molecular surveillance of hepatitis C. *Antivir Ther* **17**:1465-1470.
  98. **Kim YK, Kim CS, Lee SH, Jang SK.** 2002. Domains I and II in the 5' nontranslated region of the HCV genome are required for RNA replication. *Biochem Biophys Res Commun* **290**:105-112.
  99. **Kirchhausen T, Owen D, Harrison SC.** 2014. Molecular structure, function, and dynamics of clathrin-mediated membrane traffic. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**:a016725.
  100. **Klausner RD, Donaldson JG, Lippincott-Schwartz J.** 1992. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* **116**:1071-1080.
  101. **Konan KV, Giddings TH, Jr., Ikeda M, Li K, Lemon SM, Kirkegaard K.** 2003. Nonstructural protein precursor NS4A/B from hepatitis C virus alters function and ultrastructure of host secretory apparatus. *J Virol* **77**:7843-7855.
  102. **Krieger N, Lohmann V, Bartenschlager R.** 2001. Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *J Virol* **75**:4614-4624.
  103. **Lacek K, Vercauteren K, Grzyb K, Naddeo M, Verhoye L, Slowikowski MP, Fafi-Kremer S, Patel AH, Baumert TF, Folgori A, Leroux-Roels G, Cortese R, Meuleman P, Nicosia A.** 2012. Novel human SR-BI antibodies prevent infection and dissemination of HCV in vitro and in humanized mice. *J Hepatol* **57**:17-23.
  104. **Lai CK, Jeng KS, Machida K, Lai MM.** 2010. Hepatitis C virus egress and release depend on endosomal trafficking of core protein. *J Virol* **84**:11590-11598.
  105. **Law M, Maruyama T, Lewis J, Giang E, Tarr AW, Stamataki Z, Gastaminza P, Chisari FV, Jones IM, Fox RI, Ball JK, McKeating JA, Kneteman NM,**

- Burton DR.** 2008. Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nat Med* **14**:25-27.
106. **Lee JY, Acosta EG, Stoeck IK, Long G, Hiet MS, Mueller B, Fackler OT, Kallis S, Bartenschlager R.** 2014. Apolipoprotein E likely contributes to a maturation step of infectious hepatitis C virus particles and interacts with viral envelope glycoproteins. *J Virol* **88**:12422-12437.
107. **Li K, Lemon SM.** 2013. Innate immune responses in hepatitis C virus infection. *Semin Immunopathol* **35**:53-72.
108. **Li X, Jeffers LJ, Shao L, Reddy KR, de Medina M, Scheffel J, Moore B, Schiff ER.** 1995. Identification of hepatitis C virus by immunoelectron microscopy. *J Viral Hepat* **2**:227-234.
109. **Liang Y, Shilagard T, Xiao SY, Snyder N, Lau D, Cicalese L, Weiss H, Vargas G, Lemon SM.** 2009. Visualizing hepatitis C virus infections in human liver by two-photon microscopy. *Gastroenterology* **137**:1448-1458.
110. **Lin C, Wu JW, Hsiao K, Su MS.** 1997. The hepatitis C virus NS4A protein: interactions with the NS4B and NS5A proteins. *J Virol* **71**:6465-6471.
111. **Lindenbach BD.** 2013. Virion assembly and release. *Curr Top Microbiol Immunol* **369**:199-218.
112. **Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM.** 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* **309**:623-626.
113. **Lindenbach BD, Rice CM.** 2005. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* **436**:933-938.
114. **Lindenbach BD, Rice CM.** 2013. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nat Rev Microbiol* **11**:688-700.
115. **Liu S, Kuo W, Yang W, Liu W, Gibson GA, Dorko K, Watkins SC, Strom SC, Wang T.** 2010. The second extracellular loop dictates Occludin-mediated HCV entry. *Virology* **407**:160-170.
116. **Liu S, McCormick KD, Zhao W, Zhao T, Fan D, Wang T.** 2012. Human apolipoprotein E peptides inhibit hepatitis C virus entry by blocking virus binding. *Hepatology* **56**:484-491.
117. **Liu S, Yang W, Shen L, Turner JR, Coyne CB, Wang T.** 2009. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol* **83**:2011-2014.
118. **Liu Z, He JJ.** 2013. Cell-cell contact-mediated hepatitis C virus (HCV) transfer, productive infection, and replication and their requirement for HCV receptors. *J Virol* **87**:8545-8558.



119. **Logvinoff C, Major ME, Oldach D, Heyward S, Talal A, Balfe P, Feinstone SM, Alter H, Rice CM, McKeating JA.** 2004. Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:10149-10154.
120. **Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R.** 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* **285**:110-113.
121. **Long G, Hiet MS, Windisch MP, Lee JY, Lohmann V, Bartenschlager R.** 2011. Mouse hepatic cells support assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Gastroenterology* **141**:1057-1066.
122. **Longatti A, Boyd B, Chisari FV.** 2015. Virion-independent transfer of replication-competent hepatitis C virus RNA between permissive cells. *J Virol* **89**:2956-2961.
123. **Lu X, Mehta A, Dadmarz M, Dwek R, Blumberg BS, Block TM.** 1997. Aberrant trafficking of hepatitis B virus glycoproteins in cells in which N-glycan processing is inhibited. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:2380-2385.
124. **Luo G, Xin S, Cai Z.** 2003. Role of the 5'-proximal stem-loop structure of the 5' untranslated region in replication and translation of hepatitis C virus RNA. *J Virol* **77**:3312-3318.
125. **Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, Thumann C, Fofana I, Zona L, Davis C, Mee CJ, Turek M, Gorke S, Royer C, Fischer B, Zahid MN, Lavillette D, Fresquet J, Cosset FL, Rothenberg SM, Pietschmann T, Patel AH, Pessaux P, Dooffoel M, Raffelsberger W, Poch O, McKeating JA, Brino L, Baumert TF.** 2011. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med* **17**:589-595.
126. **Ma Y, Yates J, Liang Y, Lemon SM, Yi M.** 2008. NS3 helicase domains involved in infectious intracellular hepatitis C virus particle assembly. *J Virol* **82**:7624-7639.
127. **Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C, Kirchhausen T.** 2006. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell* **10**:839-850.
128. **Martell M, Esteban JI, Quer J, Genesca J, Weiner A, Esteban R, Guardia J, Gomez J.** 1992. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* **66**:3225-3229.
129. **Martin DN, Uprichard SL.** 2013. Identification of transferrin receptor 1 as a hepatitis C virus entry factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:10777-10782.

130. **Martin N, Sattentau Q.** 2009. Cell-to-cell HIV-1 spread and its implications for immune evasion. *Curr Opin HIV AIDS* **4**:143-149.
131. **Masaki T, Suzuki R, Murakami K, Aizaki H, Ishii K, Murayama A, Date T, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T.** 2008. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J Virol* **82**:7964-7976.
132. **Mathiesen CK, Prentoe J, Meredith LW, Jensen TB, Krarup H, McKeating JA, Gottwein JM, Bukh J.** 2015. Adaptive Mutations Enhance Assembly and Cell-to-Cell Transmission of a High-Titer Hepatitis C Virus Genotype 5a Core-NS2 JFH1-Based Recombinant. *J Virol* **89**:7758-7775.
133. **Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T.** 2014. Alternative endocytosis pathway for productive entry of hepatitis C virus. *J Gen Virol* **95**:2658-2667.
134. **Matthews GV, Dore GJ.** 2008. HIV and hepatitis C coinfection. *J Gastroenterol Hepatol* **23**:1000-1008.
135. **McCormack PL.** 2015. Daclatasvir: a review of its use in adult patients with chronic hepatitis C virus infection. *Drugs* **75**:515-524.
136. **Mee CJ, Farquhar MJ, Harris HJ, Hu K, Ramma W, Ahmed A, Maurel P, Bicknell R, Balfe P, McKeating JA.** 2010. Hepatitis C virus infection reduces hepatocellular polarity in a vascular endothelial growth factor-dependent manner. *Gastroenterology* **138**:1134-1142.
137. **Meertens L, Bertaux C, Dragic T.** 2006. Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *J Virol* **80**:11571-11578.
138. **Menzel N, Fischl W, Hueging K, Bankwitz D, Frentzen A, Haid S, Gentzsch J, Kaderali L, Bartenschlager R, Pietschmann T.** 2012. MAP-kinase regulated cytosolic phospholipase A2 activity is essential for production of infectious hepatitis C virus particles. *PLoS Pathog* **8**:e1002829.
139. **Mercer J, Schelhaas M, Helenius A.** 2010. Virus entry by endocytosis. *Annu Rev Biochem* **79**:803-833.
140. **Meredith LW, Harris HJ, Wilson GK, Fletcher NF, Balfe P, McKeating JA.** 2013. Early infection events highlight the limited transmissibility of hepatitis C virus in vitro. *J Hepatol* **58**:1074-1080.
141. **Merz A, Long G, Hiet MS, Brugger B, Chlanda P, Andre P, Wieland F, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R.** 2011. Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome. *J Biol Chem* **286**:3018-3032.

142. **Meuleman P, Catanese MT, Verhoye L, Desombere I, Farhoudi A, Jones CT, Sheahan T, Grzyb K, Cortese R, Rice CM, Leroux-Roels G, Nicosia A.** 2011. A human monoclonal antibody targeting scavenger receptor class B type I precludes hepatitis C virus infection and viral spread in vitro and in vivo. *Hepatology* **55**:364-372.
143. **Meunier JC, Russell RS, Engle RE, Faulk KN, Purcell RH, Emerson SU.** 2008. Apolipoprotein c1 association with hepatitis C virus. *J Virol* **82**:9647-9656.
144. **Molina-Jimenez F, Benedicto I, Dao Thi VL, Gondar V, Lavillette D, Marin JJ, Briz O, Moreno-Otero R, Aldabe R, Baumert TF, Cosset FL, Lopez-Cabrera M, Majano PL.** 2012. Matrigel-embedded 3D culture of Huh-7 cells as a hepatocyte-like polarized system to study hepatitis C virus cycle. *Virology* **425**:31-39.
145. **Moradpour D, Brass V, Gosert R, Wolk B, Blum HE.** 2002. Hepatitis C: molecular virology and antiviral targets. *Trends Mol Med* **8**:476-482.
146. **Moradpour D, Penin F.** 2013. Hepatitis C virus proteins: from structure to function. *Curr Top Microbiol Immunol* **369**:113-142.
147. **Moradpour D, Penin F, Rice CM.** 2007. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* **5**:453-463.
148. **Mothes W, Sherer NM, Jin J, Zhong P.** 2010. Virus cell-to-cell transmission. *J Virol* **84**:8360-8368.
149. **Motley A, Bright NA, Seaman MN, Robinson MS.** 2003. Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *J Cell Biol* **162**:909-918.
150. **Nahmias Y, Goldwasser J, Casali M, van Poll D, Wakita T, Chung RT, Yarmush ML.** 2008. Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *Hepatology* **47**:1437-1445.
151. **Nakano T, Lau GM, Sugiyama M, Mizokami M.** 2011. An updated analysis of hepatitis C virus genotypes and subtypes based on the complete coding region. *Liver Int* **32**:339-345.
152. **Neveu G, Barouch-Bentov R, Ziv-Av A, Gerber D, Jacob Y, Einav S.** 2012. Identification and targeting of an interaction between a tyrosine motif within hepatitis C virus core protein and AP2M1 essential for viral assembly. *PLoS Pathog* **8**:e1002845.
153. **Neveu G, Ziv-Av A, Barouch-Bentov R, Berkerman E, Mulholland J, Einav S.** 2015. AP-2-associated protein kinase 1 and cyclin G-associated kinase regulate hepatitis C virus entry and are potential drug targets. *J Virol* **89**:4387-4404.

154. **Nielsen SU, Bassendine MF, Martin C, Lowther D, Purcell PJ, King BJ, Neely D, Toms GL.** 2008. Characterization of hepatitis C RNA-containing particles from human liver by density and size. *J Gen Virol* **89**:2507-2517.
155. **Nishitsuji K, Hosono T, Nakamura T, Bu G, Michikawa M.** 2011. Apolipoprotein E regulates the integrity of tight junctions in an isoform-dependent manner in an in vitro blood-brain barrier model. *J Biol Chem* **286**:17536-17542.
156. **Ogata N, Alter HJ, Miller RH, Purcell RH.** 1991. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:3392-3396.
157. **Okamoto H, Kojima M, Okada S, Yoshizawa H, Iizuka H, Tanaka T, Muchmore EE, Peterson DA, Ito Y, Mishiro S.** 1992. Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2-year infection in a chimpanzee: variability and stability. *Virology* **190**:894-899.
158. **Op De Beeck A, Voisset C, Bartosch B, Ciczora Y, Cocquerel L, Keck Z, Fong S, Cosset FL, Dubuisson J.** 2004. Characterization of functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Virol* **78**:2994-3002.
159. **Owen DM, Huang H, Ye J, Gale M, Jr.** 2009. Apolipoprotein E on hepatitis C virion facilitates infection through interaction with low-density lipoprotein receptor. *Virology* **394**:99-108.
160. **Paczkowski JE, Richardson BC, Fromme JC.** 2015. Cargo adaptors: structures illuminate mechanisms regulating vesicle biogenesis. *Trends Cell Biol* **25**:408-416.
161. **Paul D, Madan V, Bartenschlager R.** 2014. Hepatitis C virus RNA replication and assembly: living on the fat of the land. *Cell Host Microbe* **16**:569-579.
162. **Pavlovic D, Neville DC, Argaud O, Blumberg B, Dwek RA, Fischer WB, Zitzmann N.** 2003. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:6104-6108.
163. **Pawlotsky JM.** 2013. Treatment of chronic hepatitis C: current and future. *Curr Top Microbiol Immunol* **369**:321-342.
164. **Pawlotsky JM.** 2014. New hepatitis C virus (HCV) drugs and the hope for a cure: concepts in anti-HCV drug development. *Semin Liver Dis* **34**:22-29.
165. **Pawlotsky JM, Feld JJ, Zeuzem S, Hoofnagle JH.** 2015. From non-A, non-B hepatitis to hepatitis C virus cure. *J Hepatol* **62**:S87-S99.

166. **Peng BH, Lee JC, Campbell GA.** 2003. In vitro protein complex formation with cytoskeleton-anchoring domain of occludin identified by limited proteolysis. *J Biol Chem* **278**:49644-49651.
167. **Perrault M, Pecheur EI.** 2009. The hepatitis C virus and its hepatic environment: a toxic but finely tuned partnership. *Biochem J* **423**:303-314.
168. **Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, Shavinskaya A, Kallis S, Steinmann E, Abid K, Negro F, Dreux M, Cosset FL, Bartenschlager R.** 2006. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:7408-7413.
169. **Pietschmann T, Lohmann V, Kaul A, Krieger N, Rinck G, Rutter G, Strand D, Bartenschlager R.** 2002. Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J Virol* **76**:4008-4021.
170. **Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S.** 1998. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* **282**:938-941.
171. **Pique C, Jones KS.** 2012. Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. *Front Microbiol* **3**:378.
172. **Ploss A, Evans MJ.** 2012. Hepatitis C virus host cell entry. *Curr Opin Virol* **2**:14-19.
173. **Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, de Jong YP, Rice CM.** 2009. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* **457**:882-886.
174. **Ploss A, Rice CM.** 2009. Towards a small animal model for hepatitis C. *EMBO Rep* **10**:1220-1227.
175. **Popescu CI, Callens N, Trinel D, Roingeard P, Moradpour D, Descamps V, Duverlie G, Penin F, Heliot L, Rouille Y, Dubuisson J.** 2011. NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. *PLoS Pathog* **7**:e1001278.
176. **Popova NV, Deyev IE, Petrenko AG.** 2013. Clathrin-mediated endocytosis and adaptor proteins. *Acta Naturae* **5**:62-73.
177. **Poveda E, Wyles DL, Mena A, Pedreira JD, Castro-Iglesias A, Cachay E.** 2014. Update on hepatitis C virus resistance to direct-acting antiviral agents. *Antiviral Res* **108**:181-191.
178. **Powdrill MH, Tchesnokov EP, Kozak RA, Russell RS, Martin R, Svarovskaia ES, Mo H, Kouyos RD, Gotte M.** 2011. Contribution of a

- mutational bias in hepatitis C virus replication to the genetic barrier in the development of drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:20509-20513.
179. **Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, Lai CL.** 2003. Viral hepatitis C. *Lancet* **362**:2095-2100.
180. **Prince AM, Huima-Byron T, Parker TS, Levine DM.** 1996. Visualization of hepatitis C virions and putative defective interfering particles isolated from low-density lipoproteins. *J Viral Hepat* **3**:11-17.
181. **Reynolds GM, Harris HJ, Jennings A, Hu K, Grove J, Lalor PF, Adams DH, Balfe P, Hubscher SG, McKeating JA.** 2008. Hepatitis C virus receptor expression in normal and diseased liver tissue. *Hepatology* **47**:418-427.
182. **Robinson MS.** 2004. Adaptable adaptors for coated vesicles. *Trends Cell Biol* **14**:167-174.
183. **Rodriguez-Boulán E, Kreitzer G, Musch A.** 2005. Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**:233-247.
184. **Rupp D, Bartenschlager R.** 2014. Targets for antiviral therapy of hepatitis C. *Semin Liver Dis* **34**:9-21.
185. **Sainz B, Jr., Barretto N, Martin DN, Hiraga N, Imamura M, Hussain S, Marsh KA, Yu X, Chayama K, Alrefai WA, Uprichard SL.** 2012. Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat Med* **18**:281-285.
186. **Sainz B, Jr., Barretto N, Uprichard SL.** 2009. Hepatitis C virus infection in phenotypically distinct Huh7 cell lines. *PLoS One* **4**:e6561.
187. **Sakai A, Claire MS, Faulk K, Govindarajan S, Emerson SU, Purcell RH, Bukh J.** 2003. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:11646-11651.
188. **Sattentau Q.** 2008. Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses. *Nat Rev Microbiol* **6**:815-826.
189. **Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A.** 2002. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* **21**:5017-5025.
190. **Scheel TK, Rice CM.** 2013. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat Med* **19**:837-849.
191. **Sharma NR, Mateu G, Dreux M, Grakoui A, Cosset FL, Melikyan GB.** 2011. Hepatitis C virus is primed by CD81 protein for low pH-dependent fusion. *J Biol Chem* **286**:30361-30376.

192. **Shepard CW, Finelli L, Alter MJ.** 2005. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* **5**:558-567.
193. **Shulla A, Randall G.** 2012. Hepatitis C virus-host interactions, replication, and viral assembly. *Curr Opin Virol* **2**:725-732.
194. **Simmonds P.** 2004. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *J Gen Virol* **85**:3173-3188.
195. **Soriano V, Vispo E, de Mendoza C, Labarga P, Fernandez-Montero JV, Poveda E, Trevino A, Barreiro P.** 2015. Hepatitis C therapy with HCV NS5B polymerase inhibitors. *Expert Opin Pharmacother* **14**:1161-1170.
196. **Stapleford KA, Lindenbach BD.** 2011. Hepatitis C virus NS2 coordinates virus particle assembly through physical interactions with the E1-E2 glycoprotein and NS3-NS4A enzyme complexes. *J Virol* **85**:1706-1717.
197. **Steinmann E, Penin F, Kallis S, Patel AH, Bartenschlager R, Pietschmann T.** 2007. Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog* **3**:0962-0971.
198. **Steinmann E, Pietschmann T.** 2013. Cell culture systems for hepatitis C virus. *Curr Top Microbiol Immunol* **369**:17-48.
199. **Suzuki T.** 2012. Morphogenesis of infectious hepatitis C virus particles. *Front Microbiol* **3**:38.
200. **Tamai K, Shiina M, Tanaka N, Nakano T, Yamamoto A, Kondo Y, Kakazu E, Inoue J, Fukushima K, Sano K, Ueno Y, Shimosegawa T, Sugamura K.** 2012. Regulation of hepatitis C virus secretion by the Hrs-dependent exosomal pathway. *Virology* **422**:377-385.
201. **Tang Y, Leao IC, Coleman EM, Broughton RS, Hildreth JE.** 2009. Deficiency of niemann-pick type C-1 protein impairs release of human immunodeficiency virus type 1 and results in Gag accumulation in late endosomal/lysosomal compartments. *J Virol* **83**:7982-7995.
202. **Tarr AW, Lafaye P, Meredith L, Damier-Piolle L, Urbanowicz RA, Meola A, Jestin JL, Brown RJ, McKeating JA, Rey FA, Ball JK, Krey T.** 2013. An alpaca nanobody inhibits hepatitis C virus entry and cell-to-cell transmission. *Hepatology* **58**:932-939.
203. **Timpe JM, Stamatakis Z, Jennings A, Hu K, Farquhar MJ, Harris HJ, Schwarz A, Desombere I, Roels GL, Balfe P, McKeating JA.** 2008. Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology* **47**:17-24.

- 204. **Tong Y, Zhu Y, Xia X, Liu Y, Feng Y, Hua X, Chen Z, Ding H, Gao L, Wang Y, Feitelson MA, Zhao P, Qi ZT.** 2011. Tupaia CD81, SR-BI, claudin-1, and occludin support hepatitis C virus infection. *J Virol* **85**:2793-2802.
- 205. **Valli MB, Crema A, Lanzilli G, Serafino A, Bertolini L, Ravagnan G, Ponzetto A, Menzo S, Clementi M, Carloni G.** 2007. Molecular and cellular determinants of cell-to-cell transmission of HCV in vitro. *J Med Virol* **79**:1491-1499.
- 206. **Vieyres G, Dubuisson J, Pietschmann T.** 2014. Incorporation of hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins: the keystones on a peculiar virion. *Viruses* **6**:1149-1187.
- 207. **Vieyres G, Pietschmann T.** 2013. Entry and replication of recombinant hepatitis C viruses in cell culture. *Methods* **59**:233-248.
- 208. **Vieyres G, Thomas X, Descamps V, Duverlie G, Patel AH, Dubuisson J.** 2010. Characterization of the envelope glycoproteins associated with infectious hepatitis C virus. *J Virol* **84**:10159-10168.
- 209. **von Kleist L, Stahlschmidt W, Bulut H, Gromova K, Puchkov D, Robertson MJ, MacGregor KA, Tomilin N, Pechstein A, Chau N, Chircop M, Sakoff J, von Kries JP, Saenger W, Krausslich HG, Shupliakov O, Robinson PJ, McCluskey A, Haucke V.** 2011. Role of the clathrin terminal domain in regulating coated pit dynamics revealed by small molecule inhibition. *Cell* **146**:471-484.
- 210. **Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ.** 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* **11**:791-796.
- 211. **Walewski JL, Keller TR, Stump DD, Branch AD.** 2001. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA* **7**:710-721.
- 212. **Wang S, Beer M, Neveu G, Shulla A, Barouch-Bentov R, Randall G, Einav S.** 2014. Clathrin Adaptors Orchestrate Hepatitis C Virus (HCV) Trafficking During Viral Assembly and Release., 21st International Symposium on HCV and Related Viruses, Banff, Canada.
- 213. **Wendt A, Adhoute X, Castellani P, Oules V, Ansaldi C, Benali S, Bourliere M.** 2014. Chronic hepatitis C: future treatment. *Clin Pharmacol* **6**:1-17.
- 214. **Wernette-Hammond ME, Lauer SJ, Corsini A, Walker D, Taylor JM, Rall SC, Jr.** 1989. Glycosylation of human apolipoprotein E. The carbohydrate attachment site is threonine 194. *J Biol Chem* **264**:9094-9101.



215. **WHO**. 2014. Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis C infection. WHO.
216. **WHO**. 2014. Hepatitis C: Fact Sheet N° 164. *In* WHO (ed.).
217. **Wilson GK, Stamatakis Z**. 2012. In vitro systems for the study of hepatitis C virus infection. *Int J Hepatol* **2012**:292591.
218. **Witteveldt J, Evans MJ, Bitzegeio J, Koutsoudakis G, Owsianka AM, Angus AG, Keck ZY, Fong SK, Pietschmann T, Rice CM, Patel AH**. 2009. CD81 is dispensable for hepatitis C virus cell-to-cell transmission in hepatoma cells. *J Gen Virol* **90**:48-58.
219. **Wozniak AL, Griffin S, Rowlands D, Harris M, Yi M, Lemon SM, Weinman SA**. 2010. Intracellular proton conductance of the hepatitis C virus p7 protein and its contribution to infectious virus production. *PLoS Pathog* **6**:e1001087.
220. **Xiao F, Fofana I, Heydmann L, Barth H, Soulier E, Habersetzer F, Doffoel M, Bukh J, Patel AH, Zeisel MB, Baumert TF**. 2014. Hepatitis C virus cell-cell transmission and resistance to direct-acting antiviral agents. *PLoS Pathog* **10**:e1004128.
221. **Yi M, Lemon SM**. 2003. 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *J Virol* **77**:3557-3568.
222. **Yu X, Qiao M, Atanasov I, Hu Z, Kato T, Liang TJ, Zhou ZH**. 2007. Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstructions of hepatitis C virus particles. *Virology* **367**:126-134.
223. **Zeisel MB, Koutsoudakis G, Schnober EK, Haberstroh A, Blum HE, Cosset FL, Wakita T, Jaeck D, Doffoel M, Royer C, Soulier E, Schvoerer E, Schuster C, Stoll-Keller F, Bartenschlager R, Pietschmann T, Barth H, Baumert TF**. 2007. Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology* **46**:1722-1731.
224. **Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, Wieland SF, Uprichard SL, Wakita T, Chisari FV**. 2005. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:9294-9299.
225. **Zhu YZ, Qian XJ, Zhao P, Qi ZT**. 2014. How hepatitis C virus invades hepatocytes: the mystery of viral entry. *World J Gastroenterol* **20**:3457-3467.



PUBLICACIONES RELACIONADAS CON ESTA  
MEMORIA DE TESIS DOCTORAL

